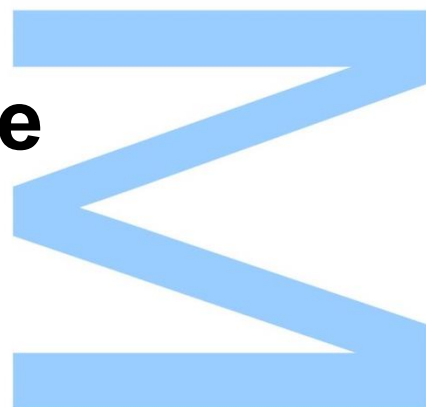




Bisfenóis (A, B, F, E, S, AF e Z) em alimentos embalados em plástico e enlatados: análise, ocorrência e toxicidade



Tatiana Rodrigues Inácio

Mestrado em Bioquímica
Departamento Química e Bioquímica
2017/2018

Orientador

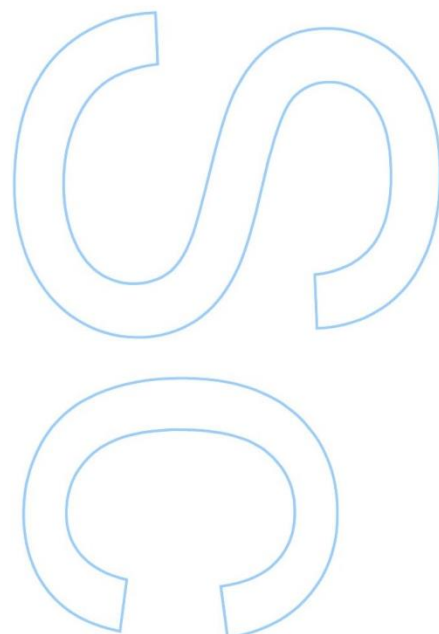
José Fernandes, Professor, Faculdade de Farmácia

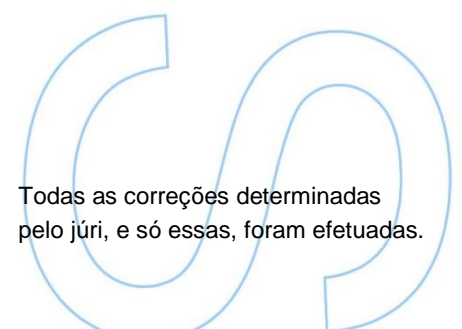
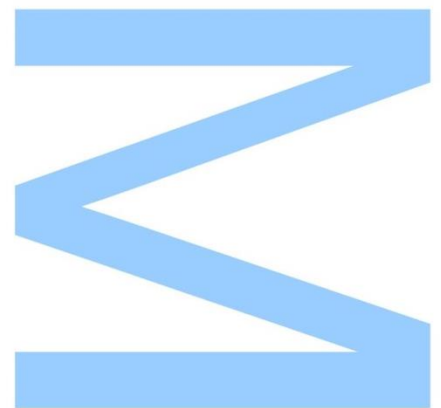
Coorientador

Sara Cunha, Investigadora, REQUIMTE

Coorientador

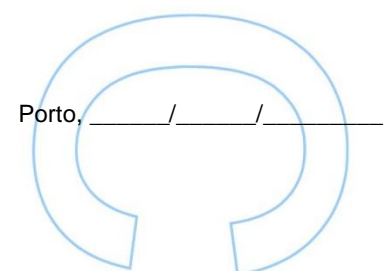
Paula Gameiro, Professora, Faculdade de Ciências





Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,



Porto, ____ / ____ / ____

Agradecimentos

À Doutora Sara Cunha e ao Professor José Fernandes gostaria de agradecer inicialmente por terem acreditado em mim e me terem aceite para a realização da minha dissertação no vosso laboratório sob a vossa orientação e também pelo apoio e transmissão de conhecimentos ao longo de toda a minha experiência prática e teórica no realizar da minha dissertação.

À Professora Paula Gameiro, por se ter disponibilizado a ficar minha co-orientadora, tendo sido indispensável para a realização da minha dissertação com parceria na FFUP.

À Professora Natércia Teixeira, agradeço toda a colaboração que teve na minha dissertação, que permitiu a utilização dos recursos do laboratório de bioquímica, e auxílio que sempre me dispensou.

À Doutora Marta Almada, que eu vi durante todo este projeto como uma mentora e inspiração, que independentemente dos problemas alheios sempre me presenteou com o seu sorriso e palavras de incentivo, agradeço toda a ajuda, disponibilidade e ensinamentos que me dispensou.

A todo o pessoal do laboratório de bromatologia e hidrologia e ao pessoal do laboratório de bioquímica, que sempre se mostraram prontos a ajudar-me em tudo o que fosse preciso.

À Bela e João P., que me concederam sempre palavras de incentivo e força para continuar a “lutar” ao longo desta dissertação sempre se disponibilizando para me ajudar no que eu precisasse.

Às minhas irmãs e irmão (emprestado), Vera, Adelaide e Tiago, nos tempos mais difíceis as vossas palavras fizeram com que acreditasse em mim.

Aos meus pais, António e Nadine, aos quais devo muito daquilo que hoje sou, toda a minha resiliência e persistência, obrigada pelo vosso apoio incondicional, por sempre terem acreditado em mim, e me terem dado a possibilidade de conseguir alcançar os meus feitos académicos de modo a assegurarem me um melhor futuro.

Ao meu amor, João André, não podia deixar de agradecer, apesar de não existirem palavras para tal, foste imprescindível para que eu conseguisse terminar a minha tese, nos dias mais escuros foste e serás sempre a minha luz.

À Mia, que não vai conseguir ler isto, mas não seria justo não a mencionar, estiveste literalmente sempre ao meu lado em todos os momentos que dediquei à escrita da minha dissertação, agradeço a tua companhia e carinho.

A todos os familiares e amigos que não pode mencionar individualmente agradeço a todo o vosso apoio e incentivo ao longo da minha vida académica.

Abreviações

AA – Anidrido acético

BPA - Bisfenol A

BPA_d – Bisfenol A deuterado

BPAF - Bisfenol AF

BPB - Bisfenol B

BPE - Bisfenol E

BPF - Bisfenol F

BPZ - Bisfenol Z

CV – Coeficiente de variação

DLLME - Microextração Dispersiva Líquido-Líquido

EFSA - *European Food Safety Authority*

EU - União Europeia

FDA - *Food and Drug Administration*

FSH - Hormona Folículo Estimulante

GC - Cromatografia Gasosa

GC-MS - Cromatografia Gasosa-Espetrometria de Massa

IGFBP-1 - Proteína de Ligação ao Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

LC - Cromatografia Líquida

LC-MS - Cromatografia Líquida - Espetrometria de Massa

LD₅₀ - Dose Letal Média

LH - Hormona Luteinizante

LLE - Extração Líquido-Líquido

LOD - Limite de Detecção

LOQ - Limite de Quantificação

MeCH - Acetonitrilo

MeOH - Metanol

MM - Massa Molecular

MTT- Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

PI – Padrão interno

SRB - Sulfarodamina B

St-T1b - Linha Celular do Estroma Endometrial Humano - Telomerase Imortalizada

TDI – Ingestão Diária Admissível

T4CE – Tetracloroetano

Abstract

Bisphenol-A (BPA) is one of the most abundant synthetic chemicals in the world, widely used in plastics, including toys and other baby products, food and beverage packages, thermal paper, and many other industrial and household products. The possible role of BPA in endocrine dysregulation, due to its mimetic activity regarding estrogen, led to its gradual prohibition, mainly in products destined for children.

In the last few years BPA has been gradually replaced by other bisphenols such as bisphenol F (BPF) and bisphenol S (BPS) whose similarity with BPA could translate in similar or even worse health effects.

In this study we aimed to identify and quantify different bisphenols, namely BPA, BPB, BPE, BPAF, BPZ, BPS and BPF in canned and plasticized food, like pâtés, sausages and pre-made meat meals. For that, a GC-MS method previously developed in Faculdade de Farmácia of Porto University was optimized.

Since bisphenols are well-known endocrine disruptors that may impair human reproductive health and fertility, we also aimed to investigate their effects on endometrial stromal cells turnover.

Therefore, the effects of BPA, BPS and BPF regarding cell proliferation and viability were tested in endometrial stromal cells. This was done using a telomerase-immortalized human endometrial stromal cell line (St-T1b), after 24 h and 48 h of treatment with biologically significant bisphenol concentrations, and analyzed through Sulforhodamine B and MTT assays.

In the packages analyzed (30 samples) it was observed that BPA was the most prevalent bisphenol, being detected in all samples, with concentrations between 0.38 µg/kg and 3.04 µg/kg. The other bisphenols were also detected in some of the samples, although at lower levels.

For the compounds tested and in the concentrations used it was possible to observe a change in the cell viability and proliferation of the used model.

Bisphenols are present in our everyday diet and may negatively impair reproductive health, although additional investigation must be enrolled, mainly regarding BPS and BPF disruptive activities.

Resumo

O Bisfenol A (BPA) é um dos compostos químicos sintéticos mais produzidos do mundo sendo amplamente utilizado como aditivos nos plásticos incluindo produtos para bebés, embalagens de comida/bebida, papel térmico e muitos outros produtos domésticos/industriais. O possível papel do BPA na desregulação endócrina resultante da sua atividade mimética à do estrogénio levou à sua proibição gradual, principalmente em produtos destinados a crianças.

Nos últimos anos, o BPA tem vindo a ser gradualmente substituído por outros bisfenóis, como o bisfenol F (BPF) e o bisfenol S (BPS), cuja similaridade química com o BPA pode traduzir-se em efeitos semelhantes ou ainda mais agravados para a saúde humana.

O objetivo primário deste estudo foi a identificação e quantificação de BPA, BPS, BPAF, BPB, BPE, BPZ e BPF em alimentos à base de carne embalados em plástico e enlatados, como patés, salsichas e refeições pré-fabricadas. Para tal, foi otimizado e validado um método de cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massa tendo como base um trabalho anterior desenvolvido na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Foram ainda estudados os efeitos dos bisfenóis BPA, BPS e BPF a nível de viabilidade e proliferação celular nomeadamente em células estromais endometriais. Estes efeitos foram analisados numa linha celular do estroma endometrial humano (St-T1b) telomerase-imortalizada, após 24h e 48h de exposição aos diferentes bisfenóis em concentrações biologicamente relevantes, utilizando ensaios de Sulforrodamina B e MTT.

No que se refere à presença de bisfenóis nas embalagens analisadas (30 amostras), observou-se que o BPA foi o bisfenol mais prevalente, sendo detetado em todas as amostras, em teores que variaram entre 0.38 µg/kg e os 3.04 µg/kg. Os restantes bisfenóis foram detetados com menor frequência e em concentrações distintas.

Para os compostos testados e nas concentrações utilizadas foi possível observar uma alteração na viabilidade e proliferação celular do modelo utilizado.

Os bisfenóis estão presentes na nossa dieta diária e podem afetar negativamente a saúde reprodutiva, embora investigações adicionais devam ser realizadas, principalmente em relação às atividades nefastas de BPS e BPF.

Índice

Agradecimentos	V
Abreviações	VII
Abstract	IX
Resumo	XI
Índice	XIII
Índice de Figuras	XVII
Índice de Tabelas	XIX
Introdução Geral	1
Objetivo da Dissertação	3
1: Parte Teórica	5
1.1: Parte Teórica – Secção Químico-Analítica	7
Bisfenóis	9
Propriedades Físico-químicas	9
Aplicações e exposição	11
Plásticos Policarbonatados	11
Resinas epóxi	12
Papel Térmico	14
Toxicocinética e metabolismo do BPA	15
Níveis de bisfenol na urina	16
Toxicidade	16
Desregulação Endócrina	17
Toxicidade reprodutiva e no desenvolvimento	17
Neurotoxicidade	18
Carcinogenicidade	19
Opinião dos organismos reguladores sobre os riscos da exposição ao BPA	20
Europa	20
Estados Unidos	21

Canadá	21
Metodologias analíticas	22
Extração líquido-líquido (LLE)	22
Extração em fase sólida (SPE)	23
Sorbentes seletivos.....	24
Sorbentes não seletivos	25
QuEChERS.....	26
Microextração Dispersiva Líquido-Líquido (DLLME)	28
Derivatização	30
Técnicas de cromatografia.....	31
Cromatografia líquida (LC ou HPLC)	32
Cromatografia Líquida - Detecção por ultravioleta (LC-UV).....	33
Cromatografia Líquida - Detecção por fluorescência (LC-FD)	33
Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa (LC-MS).....	34
Cromatografia Gasosa (GC)	35
Cromatografia Gasosa-Espetrometria de Massa (GC-MS)	36
Métodos imunoquímicos	37
1.2: Parte Teórica – Secção de Âmbito Biológico	39
Ciclo Menstrual	41
Decidualização	42
Correlação com o BPA	44
2: Parte Experimental	45
Materiais e Métodos.....	47
Reagente e padrões.....	47
Linha celular St-t1B.....	48
2.1: Parte Experimental – Secção Químico-Analítica.....	49
Procedimento analítico total	51
Quantificação.....	53
Otimização do método	54

Validação do método	58
Linearidade	58
Precisão	61
Recuperação	62
Limite de detecção e limite de quantificação	63
Aplicação da metodologia desenvolvida	64
Discussão dos resultados obtidos.....	68
Relação entre o consumo diário de BPA e o seu TDI	70
2.2: Parte Experimental – Secção de Âmbito Biológico	71
Procedimento analítico total	73
Plaqueamento celular	73
Tratamento 1	73
Tratamento 2	73
Protocolo SRB.....	74
Protocolo MTT.....	74
Resultados e discussão.....	75
3: Conclusões.....	79
4: Anexos.....	83
5: Referências.....	93

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura Geral dos bisfenóis	9
Figura 2: Síntese do polycarbonato por reação de polimerização por condensação do BPA e oxicloreto de carbono.....	12
Figura 3: Estrutura da resina epóxi de éter diglicídico de bisfenol A.....	13
Figura 4: Esquema de como funciona o papel térmico com os ácidos BPA e BPS.....	14
Figura 5: Diagrama esquemático do processo de glucuronidação do BPA no sistema hepático e a sua via de eliminação	15
Figura 6: Semelhança entre a estrutura química do BPA e do estrogénio	17
Figura 7: Mecanismo do BPA na alteração da metilação	19
Figura 8: Representação esquemática da extração líquido-líquido	23
Figura 9: Passos gerais de uma extração em fase sólida.....	24
Figura 10: Procedimento esquemático do método QuEChERS	27
Figura 11: Procedimento esquemático da microextração dispersiva Líquido-Líquido .	28
Figura 12: Espectro de massa (EI) do derivado do BPA [bis(trimetilsilil)eter BPA]	30
Figura 13: Espectro de massa de impacto de eletrónico do derivado BPA [O-bis (trifluoroacetil)BPA].....	31
Figura 14: Ciclo Menstrual e respetivas fases.....	41
Figura 15: Imagem esquemática de inputs regulatórios (parácrinos e autócrinos) que levam a decidualização	42
Figura 16: Imagem ilustrativa do protocolo de extração (QuEChERS) e concentração (DLLME).....	52
Figuras 17 : Sinal analítico de cada bisfenol com o método de limpeza utilizado; Experiencia A : 10g de amostra + 5mL de n-heptano; Experiencia B : 10 g de amostra + 5 mL de n-hexano; Experiencia C : 5g de amostra + 2,5 mL de n-heptano.	55
Figura 18: Cromatogramas sobrepostos das análises dos extratos obtidos com i) tratamento C18 + Z-sept ii) com tratamento C18 + carvão ativado iii) sem tratamento; para os 7 bisfenóis estudados em concentração de 5µg/kg	57
Figura 19: Diferentes curvas de calibração para o BPF consoante o tipo de matriz....	60
Figura 20: Níveis de BPAF nas amostras analisadas	64
Figura 21: Níveis de BFE nas amostras analisadas.....	65
Figura 22: Níveis de BPF nas amostras analisadas.....	65
Figura 23: Níveis de BPA nas amostras analisadas	66
Figura 24: Níveis de BPB nas amostras analisadas	66
Figura 25: Níveis de BPS nas amostras analisadas	67

Figura 26: Níveis de BPZ nas amostras analisadas.....	67
Figuras 27 e 28: Efeitos do composto BPA na viabilidade celular analisados por ensaios de MTT e SRB	76
Figuras 29 e 30: Efeitos do composto BPS na viabilidade celular analisados por ensaios de MTT e SRB	76
Figuras 31 e 32: Efeitos do composto BPF na viabilidade celular analisados por ensaios de MTT e SRB	77
Figuras 33 e 34: Teste de viabilidade celular para misturas de bisfenóis a 1 µM em ST-T1B de MTT e SRB, respetivamente	78

Índice de Tabelas

Tabela 1: Propriedades Físico Químicas dos bisfenóis estudados	10
Tabela 2: Parâmetros cromatográficos dos bisfenóis estudados	53
Tabela 3: Curvas de calibração e respectivo coeficiente de determinação, obtidos para cada um dos bisfenóis nos três tipos diferentes de matriz.....	59
Tabela 4: Valor de precisão Intradiário e interdiário do método otimizado.....	61
Tabela 5: recuperação (%) para cada um dos bisfenóis analisados, em três níveis de concentração distintos.....	62
Tabela 6: o LoD e LoQ ($\mu\text{g/kg}$) para todos os bisfenóis estudados	63
Tabela 7: Resumo dos resultados obtidos para cada um dos bisfenóis nas amostras analisadas.....	68
Tabela 8: Concentrações utilizadas, de bisfenol, para cada nível analisado	85
Tabela 9: Caracterização das amostras analisadas (de acordo com informação contida no rótulo).....	85

Introdução Geral

Os bisfenóis são um grupo de compostos químicos que apresentam em comum o facto de possuírem dois grupos fenólicos, sendo o bisfenol A (BPA) o mais conhecido e estudado.

O BPA é sintetizado por condensação de acetona (razão do sufixo A) com dois equivalentes do fenol. A reação é catalisada por um ácido forte, como o ácido clorídrico (HCl) ou uma resina de poliestireno sulfonada.

Apesar de ter sido desenvolvido nos meados do século XIX, somente a partir de meados do século XX passou a ser produzido em larga escala. É usado na produção de plásticos policarbonatados e resinas epóxi, que são utilizados em embalagens de plástico de alimentos, em enlatados e em diversas outras aplicações. Na década de 70 descobriu-se o seu efeito de modulação seletiva do recetor do estrogénio, sendo considerado assim como um desregulador endócrino.

Para além do BPA existem outros tipos de bisfenóis, como é o caso do BPB, BPAF, BPZ, BPS, BFE e BPF, que possuem semelhanças na sua fórmula química com o BPA e propriedades similares. Não são ainda completamente conhecidos os seus efeitos na saúde humana.

As principais fontes de exposição do homem ao bisfenol são a ingestão, a inalação e o contacto dérmico. A exposição ao bisfenol é maioritariamente realizada através da ingestão de comidas/bebidas embaladas que podem conter bisfenol devido à sua migração das embalagens. A inalação ocorre por exposição a aerossóis ou mesmo a tintas contendo BPA. Através da pele, podem ser absorvidas pequenas quantidades de BPA, por exemplo através do contato com papel térmico.

A metabolização do BPA no nosso organismo corresponde maioritariamente à sua glucoronidação. Assim, o composto encontra-se presente no sangue maioritariamente sob a forma conjugada e apenas uma pequena fração na forma livre, sendo rapidamente distribuído pelos órgãos e tecidos, não apresentando todavia afinidade especial para com nenhum órgão.

A exposição ao BPA pode originar no organismo humano anomalias no sistema reprodutor, sendo que as alterações mais significativas passam pela infertilidade ou pelo aparecimento de cancro em órgãos do aparelho reprodutivo.

Os efeitos associados à exposição ao BPA na saúde humana levaram a uma legislação cada vez mais restritiva relativamente ao uso do composto. Isto tem tido como

consequência a sua gradual substituição por outros bisfenóis nomeadamente BPF e BPS. Poucos estudos reportam o efeito destes novos bisfenóis na saúde humana; porém, já existem evidências de que o BPS terá o mesmo nível de potência estrogénica que o BPA, e o BPF poderá ser ainda mais potente.

Nesta dissertação foram desenvolvidos e otimizados métodos de extração e concentração para bisfenóis em alimentos à base de carne, em enlatados e em embalagens de plástico, procedendo-se à sua posterior deteção e quantificação por GC-MS. Para tal, recorreu-se à técnica de QuEChERS para extração acoplada com a técnica de DLLME para concentração com derivatização *in situ*. Também foram realizados ensaios de com as técnicas de MTT e SRB de modo a avaliar os efeitos de alguns bisfenóis (BPA, BPS e BPF) na proliferação e viabilidade celular em linhas celulares do endométrio uterino.

Apesar de o trabalho ter tido como objetivo o estudo de diferentes bisfenóis, o BPA será o composto mais relatado nesta dissertação, devido à falta de informação acerca de todos os compostos abordados.

Objetivo da Dissertação

Esta dissertação está dividida em duas secções, a primeira de âmbito químico analítico e a segunda de âmbito biológico.

O objetivo principal da secção químico analítico foi o de identificar e quantificar os diferentes bisfenóis (BPA, BPAF, BPZ, BPS, BFE e BPF) em alimentos à base de carne em enlatados e em embalagens de plástico. Para o efeito foi otimizada e validada uma metodologia de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa capaz de permitir a análise simultânea de todos os bisfenóis em estudo.

Na secção de âmbito biológico, o foco passou pela investigação dos efeitos causados pelo BPA, BPS e BPF em culturas celulares do estroma uterino.

Desta forma pretendeu-se correlacionar a presença e quantidade de bisfenóis em alimentos do dia-a-dia com os efeitos que poderão ser esperados em células do endométrio devido a essa exposição.



1: Parte Teórica



1.1: Parte Teórica – Secção Químico-Analítica

Bisfenóis

Propriedades Físico-químicas

Os bisfenóis são compostos fenólicos de estrutura química semelhante que possuem em comum dois fenóis juntos por um *linker* distinto (Figura 1). O primeiro a ser sintetizado foi o BPA, em 1891, pelo químico Alexander Dianin [1].

Contudo, só a partir dos anos 50 do século XX é que o BPA começou a ser utilizado como componente de plásticos policarbonatos e resinas epóxi, sendo usado até hoje em diferentes indústrias, com maior relevo para a indústria alimentar [2].

Após o aparecimento do BPA, começaram a surgir muitos outros bisfenóis, com propriedades físico-químicas semelhantes, como o BPB, BPE, BPZ, BPS, BPF e BPAF. Diversos estudos reportam que estes bisfenóis podem ter as mesmas aplicações do BPA. As investigações realizadas ainda estão numa fase preliminar pelo que ainda não são conhecidas todas as suas propriedades físico-químicas [3].

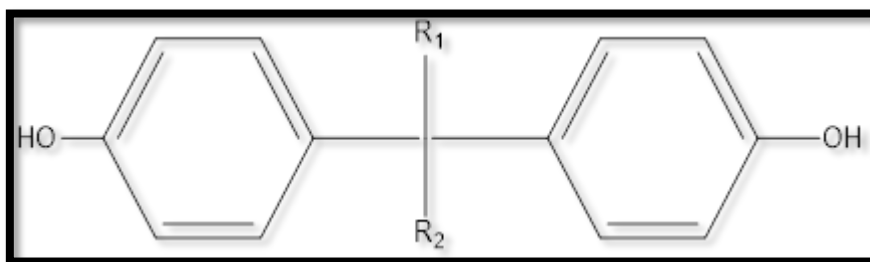


FIGURA 1: ESTRUTURA GERAL DOS BISFENÓIS

TABELA 1: PROPRIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DOS BISFENÓIS ESTUDADOS

BPs	R1	R2	Solubilida de em água (mg/L)	Massa Molecular (g/mol)	Ponto Fusão (°C)	Ponto Ebulição (°C)	Densidade g/cm ³	Pka	log K _{ow}	Ref.
BPA	CH ₃	CH ₃	300	228,29	159	220	1,20	10,29	3,64	[4, 5]
BPB	CH ₃	C ₂ H ₅	100000	242,31	121,7	--	--	10,27	4,15	[5, 6]
BPS	SO	SO	Insolúvel	250,17	--	250	1,36	7,64	2,1 4	[5, 7]
BPE	C ₂ H ₅	-/-	--	212,24	--	--	--	10,10	3,23	[5, 8]
BPF	CH ₃	-/-	--	200,24	--	--	--	9,91	2,76	[5, 9]
BPZ	C ₆ H ₁₀	-/-	--	268,36	--	--	--	9,91	4,87	[5,10]
BPAF	CF ₃	CF ₃	Insignifi- cante	336,23	162	400	1,45	8,74	3,98	[5, 11]

-- : NÃO EXISTE INFORMAÇÃO; -/-: NÃO CONTÉM; REF: REFERÊNCIAS

Para uma melhor compreensão dos diferentes bisfenóis, as suas propriedades físico-químicas são apresentadas na Tabela 1.

A massa molecular dos bisfenóis varia de 200,24 g/mol a 336,23g/mol, respetivamente para o BPE e o BPAF [5, 8].

Relativamente aos seus pontos de fusão e ebulição, não existe a informação completa para alguns dos compostos. Para os que se conhece, o ponto de ebulição varia desde 220 °C a 400 °C, para o BPA e o BPAF respetivamente, e o seu ponto de fusão varia entre 121.7 °C e 162 °C, respetivamente para o BPB e o BPAF [5, 6].

A solubilidade em água é uma característica chave que indica a capacidade de dissolução do composto numa solução aquosa [12]. Para os bisfenóis em que esse indicador é conhecido existem diferenças discrepantes, desde insolúvel como o BPS a muito solúvel (100 g/L), como o BPB [5, 6].

O pKa fornece-nos indiretamente o Ka, que é uma constante de dissociação ácida, sendo esta uma constante de equilíbrio que exprime o grau de dissociação para um dado Ácido de Brønsted numa reação de equilíbrio químico. Conforme os valores de pKa, podemos aferir a força ácida ou alcalina de um composto. O pKa dos diferentes

bisfenóis varia de 8 a 10,29, para o BPS e o BPA, respectivamente, o que sugere que os bisfenóis são ácidos fracos [14].

O coeficiente de partição Kow é de extrema importância para a determinação do destino ambiental dos produtos químicos orgânicos. Os valores de Kow variam de 2,14 a 4,87, respectivamente para o BPS e BPZ, o que significa que o BPZ é o bisfenol mais hidrofóbico dos bisfenóis apresentados na tabela 1 e o BPS o mais hidrofílico [12].

Aplicações e exposição

As aplicações dos vários bisfenóis são semelhantes entre si o que se justifica devido à sua estrutura semelhante. De uma forma geral, podem ser divididas em três grandes grupos:

- I. Plásticos policarbonatados
- II. Resinas epóxi
- III. Papel térmico

Para além destas, existem inúmeras aplicações utilizadas em menor escala como, por exemplo, aplicações ao nível das suas propriedades fungicidas, antioxidantes e antimicrobianas [13].

Plásticos Policarbonatados

Os plásticos policarbonatados são polímeros de cadeia longa, considerados termoplásticos uma vez que se apresentam moldáveis aquando do seu aquecimento; para além desta particularidade são também muito resistentes e incolores o que permite a sua utilização em diferentes tipos de produtos [14].

O plástico policarbonato mais usual é constituído por BPA e COCl_2 (oxicloreto de carbono ou fosgénio) sendo categorizado pelo código de identificação de resina (RIC), como "other" ou o número 7. O BPA e o COCl_2 reagem de forma a originar o policarbonato (reação bifásica), sendo que numa primeira fase o ácido clorídrico é eliminado com uma base aquosa e de seguida os grupos fenólicos são eliminados [15] (Figura 2).

Devido aos efeitos prejudiciais do BPA, este composto tem sido substituído por outros tipos de bisfenóis, tais como o BPF e o BPS [3].

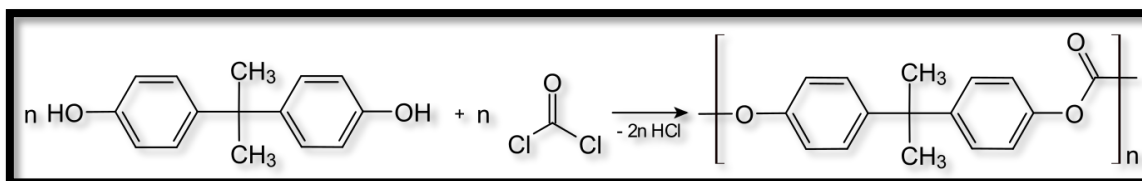


FIGURA 2: SÍNTESE DO POLICARBONATO POR REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO POR CONDENSAÇÃO DO BPA E OXICLORETO DE CARBONO. IMAGEM ADAPTADA DE [HTTPS://EN.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/POLYCARBONATE# /MÉDIA/FILE: POLYCARBONATSYNTHESE.SVG](https://en.wikipedia.org/wiki/Polycarbonate#/media/File:Polycarbonatsynthese.svg); ACEDIDO A 20 MAIO 2018

As aplicações dos policarbonatos são bastante numerosas, tais como componentes eletrônicos, materiais de construção, CDs e DVDs, componentes de automóveis, embalagens de alimentos, entre muitas outras [14].

Nos últimos tempos tem-se vindo a assistir a um forte debate acerca da utilização de BPA na constituição dos plásticos policarbonatados presentes a nível alimentar, devido à possível migração do BPA para os alimentos [16].

A contaminação por parte dos bisfenóis ocorre maioritariamente quando a embalagem é sujeita a temperaturas elevadas, por volta dos 80 °C e abundante humidade. Contudo, mesmo em condições de temperatura ambiente pode ocorrer a contaminação dos alimentos; o problema é particularmente grave quando as embalagens são sujeitas de forma periódica a temperaturas elevadas, como é o caso dos biberões que são aquecidos várias vezes ao dia para o aquecimento do leite infantil [14, 16].

A exposição dos bisfenóis originada pelo uso de embalagens policarbonatadas com estes compostos tem lugar pela ingestão do alimento/bebida contido no interior das embalagens ou, no caso de biberões, em que a criança ingere diretamente da própria embalagem, não apenas por ingestão, mas também por contacto dérmico nas mucosas bocais [17].

Resinas epóxi

As resinas epóxi, ou poliepóxidos, pertencem à classe de pré-polímeros reativos e polímeros que contêm grupos epóxido. Estas resinas reagem com uma ampla gama de co-reagentes, podendo reagir com outras resinas epóxi através de homopolimerização, e podendo também reagir com bisfenol (Figura 3). [18] Os co-reagentes são responsáveis pelo endurecimento do polímero, sendo que a reação de poliepóxidos vai

formar um polímero termoendurecível, com propriedades de grande relevo para diferentes indústrias [19].

As resinas epóxi são responsáveis pelo revestimento, através de uma camada fina na superfície interna, de latas metálicas de alimentos e bebidas, o que é essencial para diminuir a corrosão da lata e a contaminação de alimentos e bebidas com metais dissolvidos. O revestimento também ajuda a evitar que alimentos enlatados sejam contaminados ou estragados por contaminação bacteriana [20].

As resinas epóxi podem ter como co-reagente o BPA, (Figura 3), podendo também ser produzidas com o BPF; estas resinas são a combinação de epicloridrina e o bisfenol escolhido (BPA ou BPF); as resinas formadas com o co-reagente BPF possuem uma menor viscosidade [21].

As suas propriedades são várias, entre as quais: [19]

- i. grande capacidade de adesão;
- ii. boa permeabilidade;
- iii. elevada viscosidade
- iv. resistência

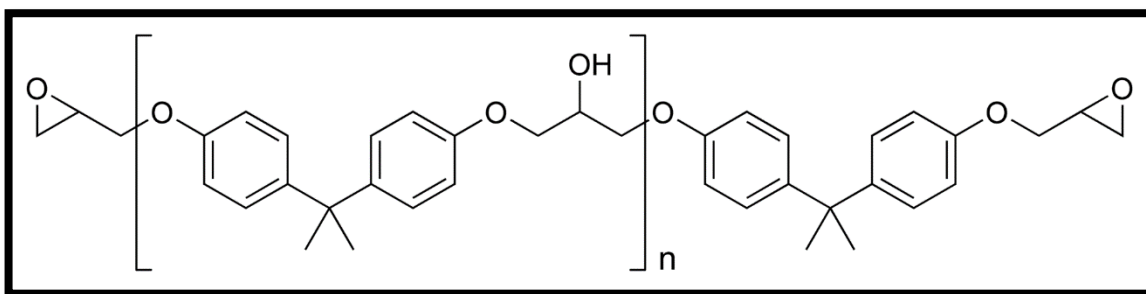


FIGURA 3: ESTRUTURA DA RESINA EPÓXI DE ÉTER DIGLICIDÍLICO DE BISFENOL A: N DENOTA O NÚMERO DE SUBUNIDADES POLIMERIZADAS. IMAGEM ADAPTADA DE [HTTPS://EN.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/EPOXY #/MÉDIA/FILE:EPOXY_PREPOLYMER_CHEMICAL_STRUCTURE.SVG](https://en.wikipedia.org/wiki/Epoxy#/Média/File:Epoxy_prepolymer_chemical_structure.svg); ACEDIDO A 20 MAIO 2018

As aplicações destas resinas são muito extensas sendo que vão desde a indústria petrolífera até à indústria alimentar [21].

O processo de cura, processo este definido pela mudança das propriedades químicas e físicas da resina, dá-se a temperaturas elevadas (130-180 °C), usualmente na presença de um catalisador. O material resultante tem ligações éter e exibe uma maior resistência à oxidação do que a normalmente obtida por cura com outros compostos químicos [21].

A exposição às resinas epóxi, tal como aos plásticos carbonatados, é maioritariamente realizada pela ingestão de alimentos, neste caso alimentos enlatados que estão em contacto com a resina e acabam por ficar contaminados [17].

Papel Térmico

O papel térmico é um papel impregnado com uma substância química que muda de cor quando exposta ao calor. É utilizado em impressoras térmicas e em vários dispositivos, tais como máquinas de calcular e caixas registadoras [22].

O papel térmico, criado nos anos 60, é atualmente usado em todo o mundo em quantidades industriais. Porém, a sua qualidade foi otimizada ao longo dos anos. Hoje em dia é utilizado abundantemente nas máquinas registadoras de quase todos os supermercados, a nível mundial [22].

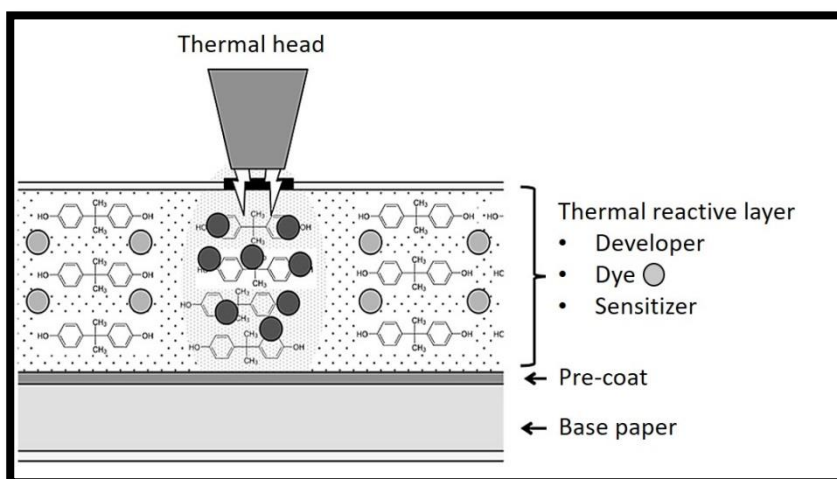


FIGURA 4: ESQUEMA DE COMO FUNCIONA O PAPEL TÉRMICO COM OS ÁCIDOS BPA E BPS, ADAPTADO DE: [HTTPS://WWW.ECOCENTER.ORG/HEALTHY-STUFF/PAGES/RECEIPT-PAPER-STUDY-2018/BACKGROUND](https://www.ecocenter.org/healthy-stuff/pages/receipt-paper-study-2018/background); ACEDIDO A 20 MAIO 2018

A vantagem deste papel reside na eliminação de tinta para escrita [22]. É revestido com uma mistura de um corante específico e uma matriz (Figura 4). Assim que a matriz é exposta a uma temperatura acima do seu ponto de fusão o corante reage com o BPA (ou BPS) ficando na sua forma colorida [23, 24].

A exposição a bisfenóis a partir do papel térmico é feita quase exclusivamente pelo contacto dérmico, sendo absorvido em pequenas quantidades para a corrente sanguínea [23, 24].

Toxicocinética e metabolismo do BPA

Após ingestão de BPA, este vai ser rapidamente absorvido, sofrendo metabolização de primeira passagem no fígado, com o auxílio das enzimas UDP-glucuroniltransferases polimórficas (UGP) [25, 26]. A via principal de metabolização é a glucuronidação (80% a 90%) correspondendo o metabolito formado ao BPA-glucuronido, que corresponde a uma forma biologicamente inativa (sem atividade estrogénica) e que fica presente na circulação sistémica até ser excretado pela urina, apresentando uma semi-vida inferior a 6 horas (Figura 5). O BPA pode também ser inativado por sulfatação [27, 28].

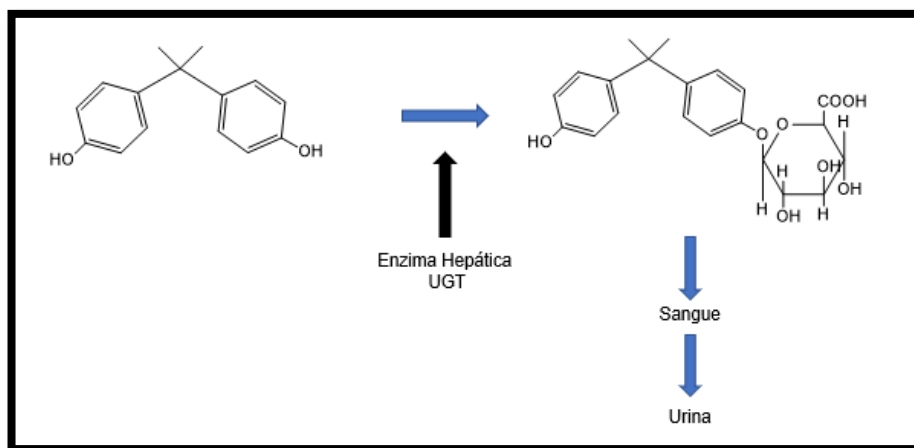


FIGURA 5: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO PROCESSO DE GLUCURONIDAÇÃO DO BPA NO SISTEMA HEPÁTICO E A SUA VIA DE ELIMINAÇÃO

A glucuronidação é responsável por cerca de 80% a 90% e é mediada por uma das isoformas da UGT, a UGT2B15, localizada no retículo endoplasmático, sendo responsável pela conversão de pequenos compostos lipofílicos (tal como o BPA) em glucuronídeos solúveis em água, principalmente a nível hepático [29]. Na fase gestacional dos mamíferos, os níveis de UGT no fígado estão em menor quantidade, o que torna mais difícil a metabolização do BPA e consequente excreção deste [26, 30].

A sulfatação do BPA é uma outra forma de o organismo metabolizar o BPA. Esta é mediada por sulfotransferases, também ao nível do sistema hepático, sendo que a principal sulfotransferase responsável pela metabolização do BPA é a SLULT1A1 (fenol sulfotransferase simples de fenol) [31].

Níveis de bisfenol na urina

Como referido anteriormente, o BPA e os seus derivados são excretados pela urina. Estudos realizados em Portugal com um total de 20 amostras de diferentes indivíduos, revelou que o BPA livre se encontrava em 45% das amostras e que o BPA livre mais o BPA conjugado se encontrava em 85% das amostras, com concentrações entre 0,39 µg/L e 4,99 µg/L. No caso do BPB este foi identificado na sua forma conjugada em apenas duas das amostras analisadas [32].

Uma investigação realizada nos Estados Unidos, com uma amostra de 371 adultos, revelou que 95% continha BPA, com uma concentração média de 1,33 µg/L e uma mediana de 1,28 µg/L [33].

No Japão, um estudo com uma amostragem de 166 mulheres adultas, revelou uma concentração média de 1,6 µg/L [34]. Pode-se verificar pelos dados acima que globalmente as concentrações de BPA presentes na urina não diferem muito.

Toxicidade

Sabe-se que o BPA possui toxicidade aguda moderada para vertebrados, apresentando uma Dose Letal 50 (DL50) em mamíferos de 6500 mg/kg de peso corporal por ingestão oral [30].

Todos os bisfenóis, devido à semelhança com o BPA, deverão exibir toxicidade similar; todavia a toxicidade de cada um deles não está ainda descrita, sendo por isso um tópico não abordado.

O uso de BPA nas embalagens alimentares, na década de 70, foi determinado como seguro tendo em conta a sua rápida metabolização e consequentemente a sua reduzida concentração sanguínea [35].

Nos últimos 20 anos têm sido realizadas pesquisas intensivas relativamente aos mecanismos tóxicos, teratogénicos, e carcinogénicos do BPA. Mais recentemente, têm também sido realizados estudos para avaliação da toxicidade do BPF e BPS. Os seus principais mecanismos de toxicidade vão ser abordados mais à frente [36] [37].

Desregulação Endócrina

Um desregulador endócrino é qualquer substância que consegue imitar, total ou parcialmente, o efeito de hormonas naturais do organismo. No caso do BPA, este consegue mimetizar uma das hormonas estrogénicas, como é o caso do 17 β -Estradiol, e apresentar uma afinidade para os seus recetores devido as suas semelhanças estruturais, como se verifica na figura 6 [38, 39].

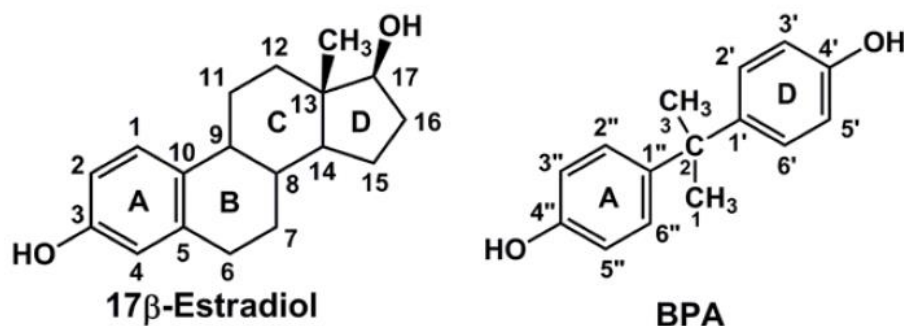


FIGURA 6: SEMELHANÇA ENTRE A ESTRUTURA QUÍMICA DO BPA E DO ESTROGÉNIO, ADAPTADO DE: [HTTPS://WWW.NATUROPATHICCURRENTS.COM/ARTICLES/ENVIRONMENTAL-CONTAMINANTS-IMPACT-FEMALE-FERTILITY](https://www.naturopathiccurrents.com/articles/environmental-contaminants-impact-female-fertility); ACEDIDO A 20 MAIO 2018

Este efeito de desregulação endócrina poderá ter dois efeitos principais no organismo: efeito agonista do estrogénio, aumentando assim os níveis da atividade do recetor de estrogénio; e um efeito antagonista dos recetores andrógenos, responsáveis pela deteção da testosterona, hormona sexual masculina [38].

O BPA é um xenobiótico com capacidade de originar perturbações na função normal do sistema endócrino atualmente classificado como um estrogénio fraco. Já se sabe para o caso do BPS que este possui a mesma atividade estrogénica que a do BPA e no caso do BPF sabe-se que este possui um poder estrogénico maior do que o próprio BPA [40]. Relativamente, aos outros bisfenóis, ainda se desconhecem as suas respetivas atividades estrogénicas.

Toxicidade reprodutiva e no desenvolvimento

Sabe-se que o BPA e os seus derivados conseguem chegar ao feto através da placenta. Uma vez que o feto possui baixos níveis da enzima UGT, o seu metabolismo vai ser

deficiente para este composto o que leva a efeitos mais exacerbados do que se verifica nos adultos [41].

Vários estudos epidemiológicos demonstraram que o BPA exerce efeitos adversos tanto no sistema reprodutor feminino como no masculino. Os sintomas no homem passam pela infertilidade devido a uma diminuição da produção de testosterona que consequentemente leva a uma diminuição substancial da contagem de espermatozoides [42]. A presença de BPA nos homens foi também correlacionada com uma hiperplasia da próstata [43].

Existem também estudos epidemiológicos que demonstram que as mulheres inférteis têm níveis séricos superiores de BPA em comparação com mulheres férteis. Também foi demonstrado que níveis elevados de BPA no sangue diminuem a taxa de sucesso dos tratamentos de fertilização *in vitro* [42, 44].

O BPA está também associado à sensibilização alérgica, inflamação brônquica e aquando de exposição no estado fetal, provoca uma diminuição na capacidade dos pulmões em bebés e crianças [45]. Foi também demonstrado que a exposição ao BPA tem um impacto muito mais nefasto durante a gravidez, visto afetar as vias importantes no desenvolvimento do pulmão da criança. Após o nascimento, os efeitos estão intimamente relacionados com problemas de imunidade, asma e diminuição da caixa torácica; porém, o mecanismo associado a estes fenómenos ainda não se encontra descrito [45, 46].

Neurotoxicidade

Existem vários estudos que demonstram que o BPA induz neurotoxicidade em humanos e animais de laboratório, mesmo em baixas concentrações. Um estudo realizado com ratinhos, mostrou que ratinhos adolescentes expostos ao BPA em concentrações baixas de 0,5 mg/kg apresentavam danos nas células cerebrais [47]. A exposição crónica ao BPA acabava por levar a uma diminuição do desenvolvimento cerebral, dando origem a uma menor capacidade de memória [48].

Está também demonstrado que a exposição ao BPA está associada a efeitos neurológicos, como a ansiedade, depressão, hiperatividade e até mesmo agressividade em crianças [49].

O BPA, sendo um desregulador endócrino que possui afinidade para os recetores estrogénicos (expressos no sistema nervoso central) [50], consegue alterar funções através do sistema hormonal, mesmo em baixas concentrações. Isto leva a consequências a longo prazo para o desenvolvimento neurocomportamental do feto [51]. No entanto, o mecanismo do BPA que leva a esta desregulação está ainda por descrever [51].

Carcinogenicidade

Embora não se conheça totalmente o mecanismo de ação do BPA em humanos, os efeitos *in vitro* do BPA são mediados principalmente pela sua ligação aos recetores estrogénicos nucleares ou pela sinalização não genómica iniciada na membrana pelo GPR30 (ou GPER Recetor de estrogénio acoplado à proteína G). A exposição, *in vivo*, ao BPA denota alterações ao código epigenético modificando a expressão génica nos órgãos sexuais (Figura 7) [52].

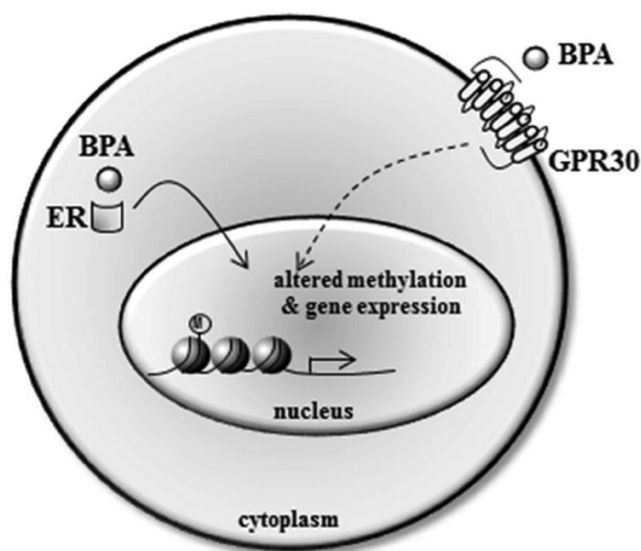


FIGURA 7: MECANISMO DO BPA NA ALTERAÇÃO DA METILAÇÃO, ADAPTADO :
[HTTPS://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PMC/ARTICLES/PMC4783235/FIGURE/F1/;](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4783235/figure/F1/)
ACEDIDO A 20 MAIO 2018

Vários estudos acerca do BPA demonstram que este é um carcinogénico que afeta mais do que um órgão tanto nos homens como nas mulheres. Estudos relatam que

estrogénios sintéticos, tais como o BPA, aumentam a incidência de cancro da mama em 26%, e de cancro da próstata e testicular em 94% e 56%, respetivamente [53].

Sabe-se também que a suscetibilidade ao cancro pode ser estabelecida durante o desenvolvimento do feto aquando de contacto com o BPA. Como já referido acima, o composto passa pela placenta durante o período de gestação, sendo que o mecanismo de metabolização do mesmo no feto é deficiente e, como tal, os tecidos que se estão a desenvolver com estímulos endócrinos normais acabam por ser alterados pelo BPA, aquando do desenvolvimento dos órgãos. Essa alteração pode então levar ao aumento da predisposição de cancro nos indivíduos em adultos [54].

Opinião dos organismos reguladores sobre os riscos da exposição ao BPA

Europa

Na Europa, o organismo responsável pela segurança alimentar é a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA). A posição da EFSA acerca do BPA tem variado ao longo do tempo. Durante muito tempo, a EFSA considerou como seguro para os consumidores a presença de BPA nas embalagens contendo produtos alimentares. Com base nos dados toxicológicos disponíveis manteve durante vários anos um valor de Ingestão Diária Tolerável (TDI) de 0.05 mg / kg de peso corporal [55, 56].

A Comissão Europeia, em Janeiro de 2011, revelou não estar de acordo com a avaliação prévia realizada pela EFSA, tendo proibido o fabrico e posteriormente venda (em Junho do mesmo ano) de biberões contendo BPA [57, 58].

No mesmo ano, no mês de Março, o Comité de Aconselhamento da Sociedade Alemã de Toxicologia completou um estudo acerca dos efeitos prejudiciais para a saúde humana da exposição ao BPA, tendo confirmado que o TDI deveria se manter a 0,05 mg/kg peso corporal/dia, e concluiu também que, de acordo com os dados na altura disponíveis, a exposição ao BPA não representava riscos para a saúde humana, incluindo recém-nascidos e bebés [59].

Em outubro de 2012, o Senado Francês, mostrou não concordar com a opinião da EU e do Comité Alemão tendo proibido, a partir de julho de 2015, todas as embalagens de plástico com BPA para alimentos [60].

Em 2013, a EFSA para impedir o desacordo Europeu a que se estava a assistir, iniciou a elaboração de um relatório, que ficou finalizado só em Janeiro de 2015. Esse relatório levou a uma mudança do em vigor TDI de 0.05 mg / kg de peso corporal para um novo TDI de 4 µg / kg de peso corporal / dia [61].

Estados Unidos

Nos Estados Unidos, a instituição responsável pela segurança alimentar é a FDA (Food and Drug Administration). Esta organização usa informação de várias fontes e realiza estudos próprios com o intuito de se certificar dos requisitos mínimos de segurança para a saúde humana [62].

Em 2009, a FDA providenciou um estudo acerca do BPA, no qual foram avaliados os riscos da utilização de BPA em embalagens alimentares, tendo concluído tratar-se de um composto seguro [62].

Em 2012, a FDA reavaliou a segurança da utilização de BPA, para responder a possíveis dúvidas levantadas com a avaliação anterior. Em resultado, proibiu o uso de BPA em biberões e chupetas. Mais tarde, em 2013, acabou também por proibir o uso de BPA em embalagens contendo leite em pó infantil [62].

No outono de 2014, especialistas da FDA em toxicologia, química analítica, endocrinologia, epidemiologia e outros campos completaram uma revisão de quatro anos de mais de 300 estudos científicos. Esta revisão não encontrou nenhuma informação que justificasse uma nova avaliação de segurança do BPA presente em embalagem de alimento [63].

Canadá

A 1ª avaliação do BPA foi feita pelo Plano de Gerenciamento Químico (CMP) do governo federal, no ano de 2008, tendo sido considerado como um composto capaz de ter efeitos nocivos sobre o ambiente e sobre a saúde humana. Em 2009, o governo anunciou que estava proibida a importação, venda e publicidade de embalagens para bebés, de policarbonato, feitas com BPA [64].

A Food Directorate of Health Canadá emitiu uma outra declaração, no mesmo ano de 2009, em que afirmou que a exposição dietética ao BPA não apresentava riscos para a saúde tanto de adultos como de crianças e recém-nascidos [64].

Em 2010, o departamento do meio ambiente do Canadá, devido a incertezas suscitadas por outros países como a França, realizou um estudo acerca dos efeitos nocivos do BPA. Neste estudo ficou estabelecido que o BPA seria considerado uma substância tóxica, tendo sido adicionado ao cronograma 1 da Lei Canadiana de Proteção Ambiental de 1999 [65].

Metodologias analíticas

Existem diferentes métodos de preparação de amostras e de técnicas cromatográficas, sendo que os métodos são fortemente condicionados pelo tipo de amostra e pelo método de quantificação utilizado.

Abaixo estão descritos os métodos de preparação e as técnicas cromatográficas mais comumente utilizados para extração e quantificação de bisfenóis em alimentos, respetivamente.

Extração líquido-líquido (LLE)

A extração líquido-líquido constitui um processo de extração e purificação de compostos orgânicos, tais como os bisfenóis, presentes em matrizes complexas. Baseia-se na mistura, seguida de agitação, da amostra ou da solução que contém a amostra com um solvente ou uma mistura de solventes imiscível no qual o(s) composto(s) de interesse sejam solúveis (Figura 8). [66] A eficiência da extração depende do coeficiente de partição entre o solvente da amostra, água geralmente, e o solvente extrator [67].

Em geral, as amostras apresentam-se dissolvidas em água, sendo que o solvente utilizado deverá ser um solvente imiscível em água, como o acetato de etilo, o clorofórmio ou o diclorometano. O acetonitrilo, miscível com a água pode ser também utilizado como solvente extrator através da técnica de QuEChERS, descrita abaixo [67, 68].

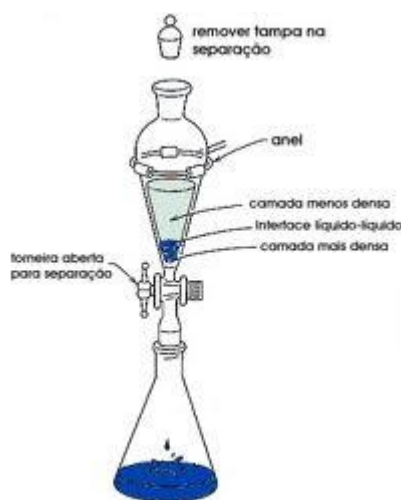


FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO, ADAPTADO DE: [HTTPS://SCIENTIFICUSBLOGPT.FILES.WORDPRESS.COM/2015/03/IMAGES.PNG](https://scientificusblogpt.files.wordpress.com/2015/03/images.png); ACEDIDO A 4 MAIO 2018

No caso de matrizes ricas em gordura, a remoção de gordura é usualmente feita com a utilização de n-heptano ou n-hexano [2]. Trata-se de uma operação importante visto que os lípidos podem danificar o desempenho tanto do cromatógrafo gasoso como do cromatógrafo líquido, afetando a superfície ativa da fase estacionária das colunas analíticas e diminuindo o poder de resolução das colunas.

Para concluir o tratamento da amostra com o LLE, realiza-se normalmente a evaporação total ou parcial do extrato. No caso de evaporação total do extrato este é posteriormente redissolvido num solvente com boas propriedades cromatográficas [69].

Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida pode ser definida como um processo em que a retenção dos compostos ocorre sobre um suporte sólido, geralmente contido no interior de uma coluna, sendo que a eluição é feita por intermédio de um ou mais solventes que atravessam esse suporte (Figura 9) [66].

O processo de preparação de amostra por SPE é baseado na separação dos compostos, dissolvidos numa mistura líquida (fase móvel), de acordo com as suas propriedades físico-químicas. Os compostos com afinidade para o sorbente pelo qual a amostra atravessa são separados dos restantes. A escolha de sorbente é baseada nas propriedades (polaridade, grupo dador/aceitador de hidrogénio) do composto que se quer analisar [70].

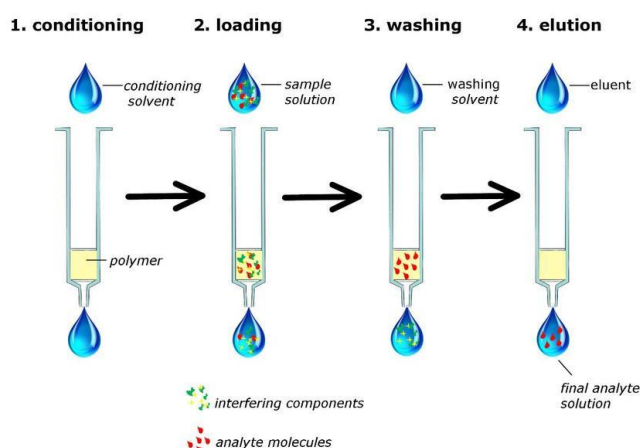


FIGURA 9: PASSOS GERAIS DE UMA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA, ADAPTADO DE:
[HTTPS://WWW.RESEARCHGATE.NET/PROFILE/MARIA_ALEXANDRA_SANDOVAL_R/PUBLICATION/320024643/FIGURE/FIG2/AS:542678711324672@1506396095832/GENERAL-STEPS-FOR-SOLID-PHASE-EXTRACTION-SPE.SNG](https://www.researchgate.net/profile/Maria_Alexandra_Sandoval_R/publication/320024643/figure/fig2/AS:542678711324672@1506396095832/GENERAL-STEPS-FOR-SOLID-PHASE-EXTRACTION-SPE.SNG); ACEDIDO A 4 MAIO 2018

Comparativamente com a LLE, a SPE exige menor quantidade de solventes orgânicos e menor quantidade de amostra; no entanto, menores volumes implicam maiores cuidados por parte do operador, de modo a permitir que não haja perdas e consequentemente menores recuperações [71].

A SPE é amplamente utilizada na extração de bisfenóis, podendo dividir-se os métodos usados de acordo com o tipo de solvente usado: os seletivos e os não seletivos. No caso de amostras com BPA, a adição de água diminui a viscosidade, resultando num melhor fluxo durante o SPE [68, 72-74].

Sorbentes seletivos

Os sorbentes tradicionais (não seletivos) de SPE apresentam falta de seletividade para o BPA em matrizes complexas o que torna a análise do BPA mais difícil. Recentemente,

polímeros impressos molecularmente (MIPs) para BPA foram usados como sorbentes de SPE [75] [76-78].

Esta técnica parece promissora para contornar as desvantagens de sorbentes não seletivos em SPE devido à capacidade de reconhecimento de MIPs para determinadas moléculas [79, 80].

A literatura descreve a preparação da maioria dos MIPs para BPA por polimerização ou polimerização por precipitação. Esses tipos de MIPs exibem alta seletividade, mas baixa capacidade de armazenamento e pouca acessibilidade ao local para espécies-alvo. Isto deve-se ao facto de os polímeros impressos serem geralmente grossos, e as moléculas modelo serem incorporadas nas matrizes muito profundamente [75] [77, 81].

Uma grande desvantagem deste método, é a sua alta seletividade pelo composto a extrair, o que impossibilita a extração de mais do que um bisfenol por MIP.

San Vicente et al (2004) demonstraram obter para o BPA para amostras de água do rio, um limite de deteção (LOD) e um limite de quantificação (LOQ) de 1,0 e 3,3 ng/mL, respetivamente, com linearidade de ($r^2=0.995$). As recuperações foram acima dos 92% com desvio padrão inferior a 5,0% [81].

Luo et al (2008) obtiveram para BPA em soluções aquosas, um LOD de 0,02 ng/mL e um LOQ de 0,067 ng/mL, com linearidade (r^2) de 0.990, tendo obtido recuperações superiores a 82 % com desvio padrão inferior a 3.0% [82].

Zhu et al (2010) obtiveram, para o BPA em loções de banho e cosméticos, um LOD de 0,003 ng/mL e um LOQ de 0,5 ng/mL com linearidade de ($r^2=0.9997$) As recuperações foram acima de 90% com desvio padrão inferior a 9% [83].

Sorbentes não seletivos

O principal sorbente empregado como fase sólida no SPE é o octadecilsilano (C18) ligado quimicamente a um suporte de sílica [84].

Esta preferência pelo C18 para a extração de compostos apolares como os bisfenóis deve-se à sua eficiência no processo de remoção de analitos de amostras de água e à sua disponibilidade comercial [84, 85].

Porém, as fases sólidas contendo C18 apresentam alguns inconvenientes como, por exemplo, a necessidade de volumes maiores de solventes orgânicos comuns para a remoção de solutos de maior hidrofobicidade da fase sólida e a necessidade de solventes mais hidrofóbicos [85, 86].

Carlos et al (2018) desenvolveram uma nova metodologia baseada na técnica de SPE, com a utilização de um outro tipo de sorbente à base de sílica recoberto com o polímero poli(dimetil-co-alkilmetilsiloxano) (PDAS), contendo grupos laterais C16/C18 intercalados com C1, que possui seletividade similar ao sorbente C18. Apresenta a vantagem de possuir menor hidrofobicidade, requerendo volumes menores de solventes orgânicos na etapa de eluição. [87]

Cunningham et al (2014) e *Ballesteros-Gomez et al* (2009) utilizaram como sorbente para a extração de éteres difenílicos polibromados e bisfenóis um copolímero de divinilbenzeno / N-vinilpirrolidona vinilpirrolidona, comercializado sob a designação (OASIS HLB from Waters, 30-200mg). O polímero hidrófilo de N-vinilpirrolidona atua como um aceitador de hidrogénio enquanto o polímero de divinilbenzeno hidrofóbico é responsável pela retenção do bisfenol [68, 88].

Covacian e Voorpoels, (2005) referem um passo de limpeza onde é utilizado o Florisil® (um silicato de magnésio sintético) que possibilita a remoção de certos compostos indesejados ainda presentes no extrato como, por exemplo, proteínas, o que permitirá um menor ruído de fundo nos cromatogramas obtidos e maior tempo de vida das colunas [89].

No final, os extratos são evaporados e depois redissolvidos num solvente orgânico como o n-hexano. Está descrito por diversos autores, (*Ballesteros-Gómez et al* (2018); *Carlos A. S. et al* (2009); *Maragou et al* (2006)) que este método apresenta recuperações médias entre os 57% e os 85% com desvio padrão menor que 20% [68, 87, 90].

QuEChERS

O método QuEChERS significa (do acrónimo em Inglês) ser um método rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro. Devido a estas qualidades, trata-se de um método cada vez mais utilizado na prática laboratorial. Entretanto têm surgido algumas modificações, abaixo assinaladas, com o intuito de melhorar e especificar a metodologia para extração de alguns compostos [68, 91].

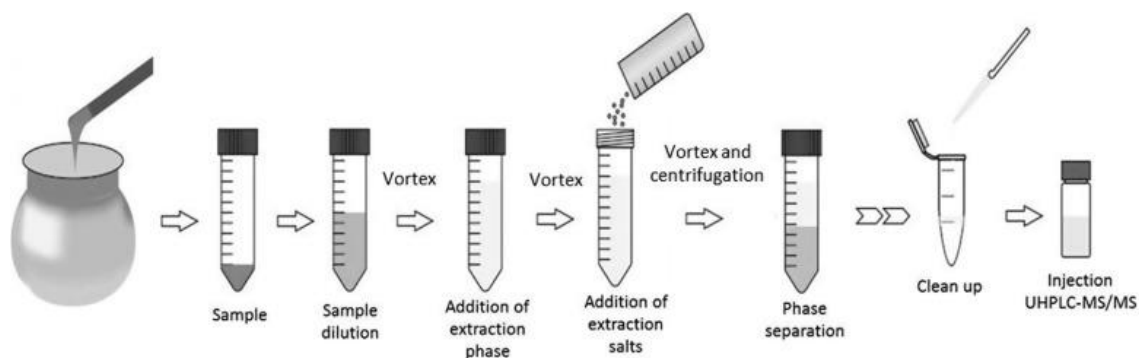


FIGURA 10: PROCEDIMENTO ESQUEMÁTICO DO MÉTODO QUECHERS, ADAPTADO DE: [HTTPS://ARS.ELS-CDN.COM/CONTENT/IMAGE/1-S2.0-S0308814616307166-GR1.JPG](https://ars.elsa-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0308814616307166-gr1.JPG); ACEDIDO A 4 MAIO 2018

Esta técnica já se mostrou útil na extração simultânea de diferentes bisfenóis [92, 93]. O primeiro passo passa pela homogeneização da amostra com água. Após este passo adiciona-se o solvente acetonitrilo (solvente extrator) na presença de sais (sulfato de magnésio e cloreto de sódio) (Figura 10). Este aumento da concentração de sais vai diminuir o número de moléculas de água disponíveis para interagir com os analitos presentes e facilitar a formação de uma fase de acetonitrilo separada da fase aquosa original, facilmente separada por centrifugação [94, 95].

Por vezes é necessário um passo prévio, no caso da amostra conter gorduras, sendo empregue um outro solvente para a remoção de material lipídico, que poderá ser o n-hexano ou n-heptano. Após agitação e centrifugação, descarta-se posteriormente a fase contendo n-hexano ou n-heptano, removendo assim as gorduras indesejadas [93].

A técnica de QuEChERS inclui uma 2ª fase, a fase do *clean up*, que consiste num processo de SPE dispersivo, visto fazer uso de sorbentes normalmente usados em SPE, geralmente em conjugação com sais inorgânicos. Nesta fase podem surgir algumas modificações ao processo original de acordo com o tipo de matriz da amostra a ser analisada [94].

Cunha *et al* (2012) recorreram aos sorbentes C18, CGB (carvão ativado) e Supelclean ENVI-Carb para a limpeza do seu extrato, proveniente de uma matriz de peixe enlatado rica em gorduras [93]. Do mesmo grupo, Cunha *et al* (2017) realizaram a fase de *clean up* por extração líquido-líquido (LLE) usando consecutivamente misturas de hexano/éter tertbutilmetílico e hexano/benzeno para eliminar os co-extraídos de uma matriz de frutos do mar enlatados [94].

Por vezes, pode ser necessário um passo de concentração do extrato em amostras alimentares realizando-se o DLLME em conjunto com o QuEChERS [91, 93].

Pereira et al (2015) conseguiram obter para extração de BPA e BPB em cereais para bebés, um LOD variando de 0,37 a 19,19 µg/kg, e um LOQ variando de 1,24 a 63,33 µg/kg e linearidade de 0,9848. As recuperações, para 3 níveis diferentes, variaram entre os 44% e os 135% com coeficiente de variação abaixo dos 29% [96].

Cunha et al (2017) demonstraram obter em amostras de peixe, recuperações para o BPA acima dos 82% com coeficiente de variação menor que 12%, tendo obtido um LOD de 0,02 ng/g, LOQ de 0,5 ng/g e linearidade de 0,9985 [94].

Microextração Dispersiva Líquido-Líquido (DLLME)

O DLLME é um método extrativo que consiste no uso de uma mistura de um solvente orgânico de alta densidade (solvente extrator) com um solvente dispersante, miscível em água e no solvente orgânico. É caracterizado por possuir um elevado fator de enriquecimento dos compostos a ser extraídos [97]. O método já foi previamente utilizado na extração de BPA [93, 95, 98] e de BPB [32, 93, 95].

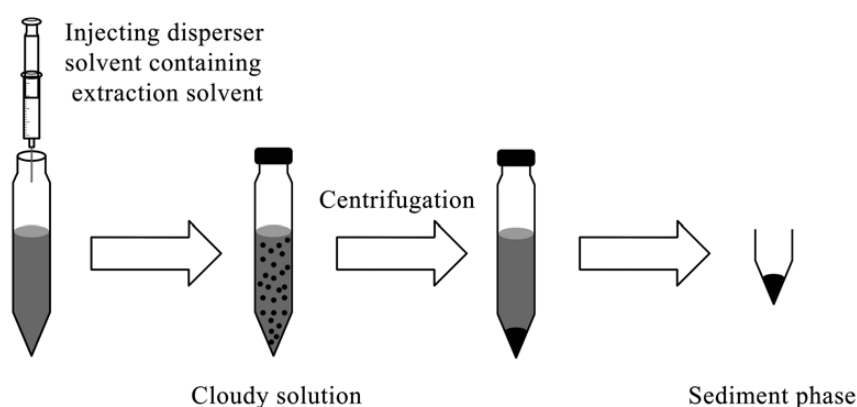


FIGURA 11: PROCEDIMENTO ESQUEMÁTICO DA MICROEXTRAÇÃO DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO, ADAPTADO DE: https://www.researchgate.net/profile/Lingxin_Chen/publication/233667604/figure/fig1/AS:393330744676355@1470788765695/fig-1-scheme-of-dllme-procedure.ppm; ACEDIDO A 4 MAIO 2018

O solvente de extração deve ser capaz de extrair analitos e ser solúvel no solvente dispersante e insolúvel em amostras aquosas tendo uma densidade maior que a da água, como é o caso dos solventes tetracloretileno e clorobenzeno [93, 98, 99]. O

solvente dispersante tem de ser solúvel em água e solúvel no solvente de extração, podendo ser o metanol ou a acetona [93, 98, 99].

Uma mistura de solvente dispersante com o solvente de extração é injetada na solução da amostra e colocada num tubo cónico com tampa de vidro (Figura 11) [97, 99]. Observa-se a formação de milhões de pequenas gotículas, as quais permitem uma área superficial de contacto entre a amostra e o solvente extrator extremamente grande, facilitando assim a transferência dos analitos. Posteriormente, é necessária uma centrifugação, onde as gotículas finas e dispersas da fase extrativa se depositam na parte inferior do tubo cónico, podendo ser removidas para posterior análise [97, 99].

A técnica de DLLME pode por vezes ser acoplada a outras técnicas extrativas, como por exemplo o QuEChERS [92, 93]. *Cunha e Fernandes* (2013) desenvolveram uma técnica de DLLME combinada, usando como solvente dispersivo a fase de acetonitrilo obtida no QuEChERS, para a determinação de BPA e BPB em verduras e frutas enlatadas por GC-MS. O procedimento envolveu o uso de tetracloroetileno como solvente extrativo e de anidrido acético como reagente derivatizante, o que permitiu que a derivatização dos compostos se desse em simultâneo com o processo extrativo. Além do fator de enriquecimento fornecido, a etapa final de extração de DLLME permitiu a acetilação simultânea dos compostos necessários para sua posterior análise em GC [100]. Nesta investigação os autores reportam para o BPA um LOD de 0.3 µg/kg e para o BPB de 0.6 µg/kg, tendo obtido um LOQ de 1,0 µg/kg para ambos. A linearidade para o BPA foi de 0.9989 e para o BPB de 0.9982. As recuperações foram acima dos 60% com coeficiente de variação inferior a 20% [100].

Cunha et al (2012) demonstraram obter, para o BPA e BPB em comida enlatada, recuperações acima dos 68% com coeficiente de variação abaixo dos 21%. O LOD e linearidade foram de 0,2 µg/kg, 0,9965 e 0,4 µg/kg, 0,9984, para o BPA e BPB respetivamente, os LOQs foram de 1 µg/kg para ambos [93].

Numa outra investigação, *Cunha et al* (2015) conseguiram obter para o BPA, em amostras de águas, um LOD de 3 ng/L e um LOQ de 10 ng/L com linearidade de 0,9970. As recuperações foram acima de 82% com coeficiente de variação inferior a 22% [98].

Derivatização

A derivatização é um processo de modificação química de compostos usado para a produção de derivados suficientemente voláteis e dotados de propriedades adequadas para a sua análise cromatográfica [101].

A principal razão do uso de reagentes derivatizantes em GC é a baixa volatilidade de alguns compostos analisados. Fatores que contribuem para a utilização de reagentes derivatizantes são: baixa volatilidade, pequenas dimensões e respetivas atrações intermoleculares que o analíto pode sofrer com grupos polares [101]. A derivatização também permite aumentar a sensibilidade do método aquando da análise por GC e GC-MS, podendo também ser utilizado para LC-MS [102, 103].

Os processos de derivatização mais utilizados para o BPA são a sililação e a acetilação [102].

A sililação é realizada usando N-O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% de trimetilclorossilano (TMCS); após a adição deste composto à nossa amostra, é necessário aquecer a solução a 80°C durante 30 minutos [104]. Isto confere, rapidamente, volatilidade ao composto com a substituição de um hidrogénio reativo de um grupo polar por um grupo alquililil, existindo apenas a formação de um único derivado [102].

No caso do BPA, o derivado formado por sililação é o [O-bis(trimethylsilyl)BPA], sendo o respetivo espectro de massa de impacto eletrónico (EI) apresentado na Figura 12 [105]. O ião molecular está presente a (m/z 372) e a perda do grupo CH_3 resulta numa maior abundância do ião (m/z 357) [105].

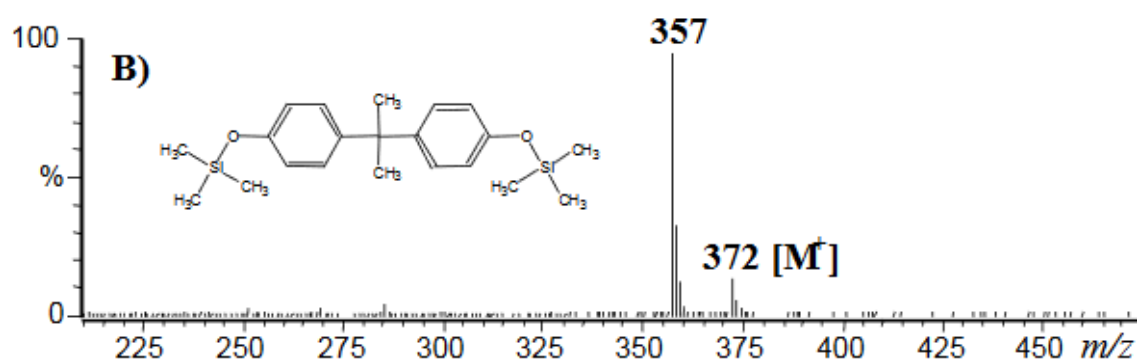


FIGURA 12: ESPETRO DE MASSA (EI) DO DERIVADO DO BPA [BIS(TRIMETILSILIL)ETER BPA], ADAPTADO DE: SZYRWINSKA, K; KOŁODZIEJCZAK, A; RYKOWSKA, I; WASIAK, W; LULEK, J; (2007) "DERIVATIZATION AND GAS CHROMATOGRAPHY-LOW-RESOLUTION MASS SPECTROMETRY OF BISPHENOL A" ACTA CHROMATOGRAPHICA 18, 49-58

A acetilação consiste na introdução de um grupo acilo numa molécula que contém um átomo de hidrogênio reativo. As reações que ocorrem neste procedimento proporcionam uma maior estabilidade ao composto a analisar [101]. A acetilação é um outro processo de derivatização dos bisfenóis e é realizada com anidrido acético ou anidrido trifluoroacético, não envolvendo tempos de incubação e/ou temperaturas específicas [68, 106].

No caso do BPA, este processo vai permitir a obtenção do derivado [O-bis (trifluoroacetil)BPA] [101]. Para este derivado o pico mais intenso no espectro de massa por EI (impacto eletrônico) corresponde ao íon fragmentado $[M-15]^+$ (m/z 405), formado a partir de um íon molecular (m/z 420) pela perda de um grupo metilo (Figura 13) [68].

O derivado [O-bis (trifluoroacetil)BPA] proporciona maior sensibilidade devido a possuir massa molecular superior à do [O-bis(trimetilsilil)BPA] [68].

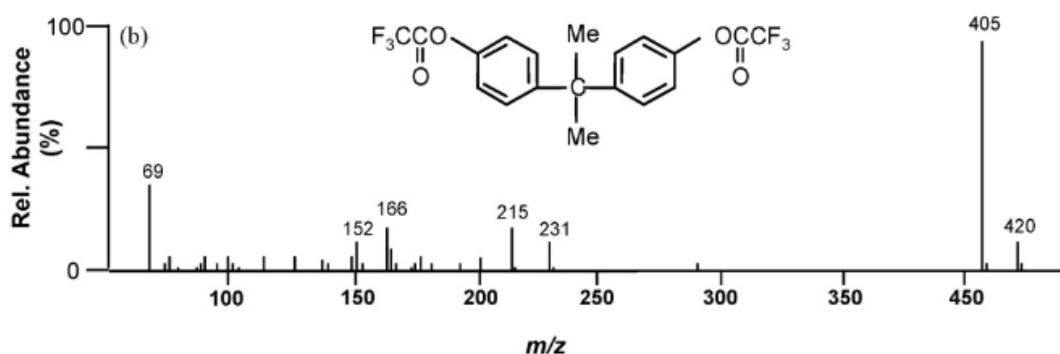


FIGURA 13: ESPECTRO DE MASSA DE IMPACTO DE ELETRÔNICO DO DERIVADO BPA [O-BIS (TRIFLUOROACETIL)BPA], ADAPTADO DE: BALLESTEROS-GOMEZ, A; RUBIO, S; PEREZ-BENDITO, D. (2009) "ANALYTICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF NISPHENOL A IN FOOD" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, 1216, 449-69

Técnicas de cromatografia

As principais técnicas de determinação de bisfenóis são a cromatografia líquida e cromatografia gasosa [68].

A cromatografia líquida poderá ser considerada como mais simples do que a GC visto não necessitar do passo de derivatização; porém, a cromatografia gasosa possibilita maior resolução analítica [68].

Cromatografia líquida (LC ou HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica usada para separar, identificar e quantificar os diferentes componentes e um extrato. Esta técnica depende de bombas para fazer passar um líquido pressurizado e o extrato representativo da amostra, através de uma coluna cheia de uma fase estacionária, capaz de possibilitar a separação dos componentes da amostra. O líquido pressurizado (fase móvel) é tipicamente uma mistura de solventes (por exemplo, água / acetonitrilo ou metanol). Os analitos são separados devido aos seus diferentes graus de interação com as partículas da fase estacionária e com os solventes de eluição (fenômeno de migração diferencial), o que origina diferentes tempos de retenção [107].

A LC pode ser de fase normal, que corresponde à separação dos analitos com base na afinidade (adsorção) para uma fase estacionária polar, como sílica. Pode também ser de fase reversa que implica a separação dos analitos com base na afinidade (partilha) de uma fase estacionária líquida de constituintes apolares. No primeiro caso permite um tempo de retenção maior para moléculas que são menos apolares, enquanto que as moléculas apolares eluem mais rapidamente e no segundo caso permite um tempo de retenção maior para moléculas que são menos polares, enquanto que as moléculas polares eluem mais rapidamente [107].

A LC pode ser acoplada a diferentes detetores como a LC-UV acoplada a um detetor de ultravioleta, a LC-FD acoplada a um detetor de fluorescência e a LC-MS acoplada à espectrometria de massa, os quais vão ser abordados mais abaixo.

A determinação de bisfenóis pode ser realizada por LC usando-se normalmente colunas C18 de fase reversa. Por norma, os eluentes mais utilizados são misturas de água e acetonitrilo ou metanol. As condições de eluição como o gradiente, temperatura e pH da fase móvel dependem do número de bisfenóis a determinar e da matriz em que se encontram os compostos [108].

A eluição é normalmente em gradiente com intervalos de tempo entre 15 a 40 minutos, dependendo da amostra. A temperatura das colunas de LC é usualmente 25 °C (temperatura ambiente) sendo que para ter um menor tempo de análise e uma maior reprodutibilidade poderá usar-se uma temperatura superior, p. ex. 40°C [109].

Cromatografia Líquida - Detecção por ultravioleta (LC-UV)

O detetor ultravioleta para LC mede a absorvência da luz monocromática de um comprimento de onda entre os 190 nm e 400 nm, contra um feixe referência. A magnitude da absorvência vai ser então correlacionada com a concentração do analito no eluente [110].

Os analitos adequados para a detecção por UV contêm tipicamente ligações insaturadas, grupos aromáticos ou grupos funcionais contendo heteroátomos. Como tal, esta é uma metodologia adequada para a detecção e quantificação de bisfenóis [110].

No entanto, a LC-UV é raramente utilizada para a detecção de BPA, uma vez que o BPA é um cromóforo relativamente fraco o que leva a uma baixa sensibilidade na detecção por UV que por sua vez vai fornecer maiores LODs comparativamente com outros detetores de LC [111].

Benecyo J. (2016) relatou o uso de LC-UV para detecção de BPA e BPS em comida enlatada, tendo utilizado uma amplitude de comprimentos de onda de 240 nm a 300 nm, uma vez que o BPA absorve a 272,3 nm e o BPS 255,1 nm, contendo as amostras um pH de 7 (pH ótimo para detecção). Neste método conseguiu obter um LOD e LOQ para o BPA de 0,48 µg/mL e 1.60 µg/mL, respetivamente, com linearidade de 0.9829. Para o BPS o LOD e o LOQ foram de 0,06 µg/mL e 0.21 µg/mL, respetivamente, com linearidade de 0.9992 [112].

Li et al (2015) tendo utilizado esta metodologia para detecção de BPA em amostras de água, tendo utilizado um comprimento de onda de 227 nm e um pH de 7. Aqui foi obtido um LOD de 0.21 µg/L, com uma recuperação acima dos 90% e coeficiente de variação abaixo dos 5% [113].

Cromatografia Líquida - Detecção por fluorescência (LC-FD)

A LC-FD é usualmente o método de LC preferencial para a determinação de bisfenóis, se excluirmos as técnicas que envolvem espectrometria de massa.

O BPA apresenta fluorescência nativa com uma excitação e emissão a comprimentos de onda de 275 nm e de 305 nm, respetivamente. Contudo, para a análise simultânea de BPA e dos seus derivados, são utilizados comprimentos de onda de 273 nm e 300

nm de excitação e de emissão, respetivamente. A fase móvel é, por norma, constituída por 60% de água e 40% de acetonitrilo [5].

Na LC-FD podem existir interferências de outros fluorescentes provenientes de, por exemplo, revestimentos das latas, sendo que deve ser considerada a possibilidade da existência de falsos positivos. Para contornar esta situação, a confirmação dos resultados positivos é feita posteriormente por LC-MS [68, 114].

Fattore et al (2015) utilizaram esta metodologia para a quantificação e deteção de BPA e BPB em amostras de atum, tendo obtido um LOD e LOQ para o BPA de 1.3 ng/l e 4,3 ng/l, respetivamente, com linearidade de 0,9994. Para o BPB obtiveram um LOD e um LOQ de 3.0 ng/l e 10 ng/l, respetivamente, e linearidade de 0,9994, com recuperações médias de 100% e um coeficiente de variação abaixo dos 10% [115].

Russo et al (2016) também recorreram a esta metodologia para deteção e quantificação de BPA e derivados (BPAF, BPB, BPE, BPF) em bebidas enlatadas não alcoólicas. O LOD para cada um destes compostos foi, respetivamente, 2,85 ng/mL, 3,63 ng/mL, 2,06 ng/mL, 2,47 ng/mL, 2,78 ng/mL, e o LOQ de 9,48 ng/mL, 12,09 ng/mL, 6,87 ng/mL, 8,25 ng/mL e 9,27 ng/mL. As recuperações foram sempre acima dos 80% com coeficiente de variação abaixo dos 14% [116].

Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa (LC-MS)

Este tipo de cromatografia líquida comparativamente com os outros tipos acima descritos, é o que possibilita maior confiança na identificação dos compostos analisados [90, 117].

Cada vez mais se tem utilizado a LC associada a MS uma vez que este método fornece a identidade estrutural dos componentes individuais com alta especificidade molecular e sensibilidade de deteção [5, 90].

A composição da fase móvel é usualmente metanol-água uma vez que permite uma resposta melhor para soluções de BPA do que uma fase móvel água-acetonitrilo. Isto deve-se ao baixo ponto de ebulição da fase móvel metanol-água que vai permitir o favorecimento da desolvatação das gotículas de eletrospray [90, 117].

A análise pela LC-MS de multi-bisfenóis é realizada utilizando interfaces de ionização de pressão atmosférica, nomeadamente a ionização eletrospray (ESI) e a ionização química de pressão atmosférica (APCI) visto que permitem uma melhor sensibilidade

[5, 90]. ESI é uma técnica usada para produzir iões usando um electrospray onde uma alta voltagem é aplicada a um líquido para criar um aerossol [118]. APCI é um método de ionização suave, semelhante à ionização química, em que os iões primários são produzidos num spray de solvente [119].

Gallart-Ayala et al (2011) referem que a análise de BPA é pelo menos seis vezes mais sensível usando a ESI do que a APCI, visto que a fragmentação da molécula desprotonada pela perda do grupo CH₃ ocorre em APCI mesmo a temperaturas suaves. No entanto, a resposta na ESI para o BPA é muito dependente da fase móvel, o que pode levar a uma diminuição do sinal [120].

A maioria dos métodos de espectrometria de massa incluem a adição de um padrão interno (I.S.), para que mesmo no caso de perdas do analito se consiga quantificar o composto com rigor. Os padrões internos mais utilizados são o BPA-d16 (deuterado) e o 13C12-BPA marcado com isótopo [68].

Cunha et al (2017) recorreram à técnica de LC-MS associado a ESI para determinação e quantificação de BPA em alimentos marinhos, como peixes, tendo sido obtido um LOD de 0,07 ng/g e LOQ de 0,5 ng/g. A percentagem de recuperação foi acima de 81% com coeficiente de variação de 12% e linearidade de 0.9985 [94].

Lee et al (2017) também recorreram à técnica de LC-MS associada a ESI para determinação de BPA em amostras de cabelo. O LOD obtido foi de 3,49 ng/g e o LOQ de 11,5 ng/g. A percentagem de recuperação foi acima dos 90% com coeficiente de variação de inferior 10% e linearidade de 0,9999 [121].

Cromatografia Gasosa (GC)

A cromatografia gasosa é uma técnica cromatográfica que apresenta algumas diferenças notáveis em relação à LC. Em GC os compostos a separar têm de apresentar volatilidade pois a separação dá-se na fase gasosa. Para além disso, a separação ocorre em colunas abertas revestidas por uma fase estacionária e atravessadas por um gás de arrastamento, em regra hélio ou hidrogénio. Outra diferença é o facto de em GC a coluna estar obrigatoriamente localizada num forno onde a temperatura do processo de separação pode ser controlada com rigor [122] [102].

A análise de bisfenóis por GC implica uma etapa previa de derivatização dos compostos, face à sua reduzida volatilidade. A maior parte dos métodos propostos faz uso de

deteção por MS, o que se pode justificar pela capacidade adicional de eficácia (separação por tempo e por massa) [123].

Cromatografia Gasosa-Espetrometria de Massa (GC-MS)

A GC-MS tem sido frequentemente utilizada para a quantificação de BPA e os seus derivados [123]. Tal como na LC, poderá ser necessário um ou mais passos de limpeza no processo de preparação e extração da amostra. Isto é feito de modo a não danificar o instrumento, visto que a presença de lípidos e outros interferentes podem reduzir o seu desempenho analítico. Também como na LC, é necessário o uso de padrões internos, pelo mesmo motivo assinalado. A espetrometria de massa (MS) permite o uso de análogos isotópicos como P.I.s (padrões internos), sendo o exemplo o BPA-d16 e o BPA-d14 [68, 124].

Esta técnica permite a quantificação simultânea de diferentes bisfenóis (BPA, BPS, BPF, BPB, BPAF, BPE, BPZ), sendo que os respetivos limites de quantificação em matrizes sólidas variam entre 45 pg/g a 200 pg/g de 1 pg/g a 10 pg/g [123, 125] e em comida enlatada variam de 26,7 pg/g a 29,3 pg/g [93, 100].

Uma investigação do grupo de *Cunha et al* (2011) determinou as concentrações de BPA e BPB em leite em pó infantil, usando GC-MS para a quantificação e confirmação da presença destes compostos. Para o BPA obteve um LOD e LOQ de 5,0 ng/l e 10 ng/l, respetivamente, e para o BPB de 2,0 g/l e 7 ng/l, respetivamente. As recuperações foram acima dos 70% com coeficiente de variação inferior a 15%. A derivatização dos bisfenóis foi realizada com a adição de anidrido acético em simultâneo com DLLME [95].

Numa outra investigação do mesmo grupo, *Cunha e Fernandes* (2013) procederam à determinação de BPB e BPA em vegetais enlatados usando GC-MS para a quantificação e confirmação da presença destes compostos. Para o BPA obteve-se um LOD de 0.3 µg/kg e para o BPB de 0.6 µg/kg, tendo-se obtido um LOQ de 1,0 µg/kg para ambos. A linearidade foi para o BPA de 0.9989 e para o BPB de 0.9982. As recuperações foram acima dos 60% e o coeficiente de variação foi inferior a 20%. A derivatização dos bisfenóis, tal como no trabalho acima assinalado, foi realizada com a adição de anidrido acético [100].

Selvaraj et al (2014) fizeram uso da GC-MS para determinação de BPA em águas de rio, tendo obtido uma boa linearidade de 0,995, com LOQ e LOQ de 1,5 µg/L e 5,1 µg/L, respetivamente. A recuperação foi acima dos 93% com coeficiente de variação inferior

a 7%. A derivatização foi realizada com a adição de MSTFA (N-tert-Butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida) [126].

Turco et al (2016) utilizaram esta técnica de GC-MS para determinar BPA em amostras de mel, tendo obtido um LOD e LOQ de 0,303 mg/L e 1,013 mg/L, respetivamente, com uma boa linearidade de 0,9953. As recuperações foram acima dos 81% com coeficiente de variação inferior a 9% [127].

Correia-Sá (2018) fizeram uso da GC-MS para determinação de BPA em urina onde obtiveram uma boa linearidade de 0,998 com LOD e LOQ de 0,13 µg/L e 0,43 µg/L, respetivamente. As recuperações foram acima dos 74% com coeficiente de variação de 11%. A derivatização foi realizada com a adição dos agentes derivatizantes BSTFA (N, O-bis (Trimetilsilil) trifluoroacetamida) e TMCS (Trimetilclorossilano) numa proporção de (99:1) [128].

Cao e Popovic (2018) utilizaram a técnica de GC-MS para quantificação dos limites de deteção de BPA e dos seus derivados (BPAF, BPF, BPE e BPB). A recuperação foi sempre superior a 89% com coeficiente de variação inferior a 11%. O LOD para cada um destes compostos foi, respetivamente, 2,1 pg/g, 1,3 pg/g, 0,7 pg/g, 1,0 pg/g e 0,44 pg/g. A derivatização foi realizada com anidrido acético [129].

Métodos imunoquímicos

O ensaio ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é um teste imunoenzimático que permite a utilização de anticorpos específicos e tem sido cada vez mais utilizado para deteção de bisfenóis [130]. Estes ensaios são relativamente rápidos e realizam-se com equipamentos de fácil manutenção. Este método consiste na utilização de anticorpos monoclonais [131] e/ou policlonais [132] em ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA).

O BPA é uma molécula de pequenas dimensões e por isso não consegue iniciar uma resposta imune sem estar conjugada de modo a formar um antígeno completo. Como tal é necessário que este esteja ligado a uma molécula de maiores dimensões, sendo que os compostos de bisfenol são normalmente conjugados com a proteína albumina de soro bovino (BSA) [132].

Mei-Ping Zhao et al (2002) foram dos primeiros autores a desenvolver um método imunoquímico para o BPA, onde optaram por usar um reagente comercialmente disponível ácido (o 4,4-bis (4-hidroxi-fenil) valérico (BHPVA)) para preparar o antígeno

e produzir um anticorpo policlonal específico para os compostos de bisfenol [133]. Mais recentemente outros grupos de investigação continuam a utilizar esta técnica para a produção dos anticorpos para deteção de BPA [131, 132, 134].

Apesar desta técnica ser utilizada para deteção de BPA, no caso de amostras alimentares ou outro tipo de amostras sólidas será sempre necessário um tratamento das amostras por outras técnicas como, por exemplo, o SPE visto que esta técnica apenas se mostra útil em amostras com matrizes mais simples, como água e urina [135].



1.2: Parte Teórica – Secção de Âmbito Biológico

Ciclo Menstrual

O ciclo menstrual é de 28 dias em média, em que as hormonas sexuais, o estrogénio e a progesterona, apresentam um papel crucial na sua regulação (Figura 14) [136].

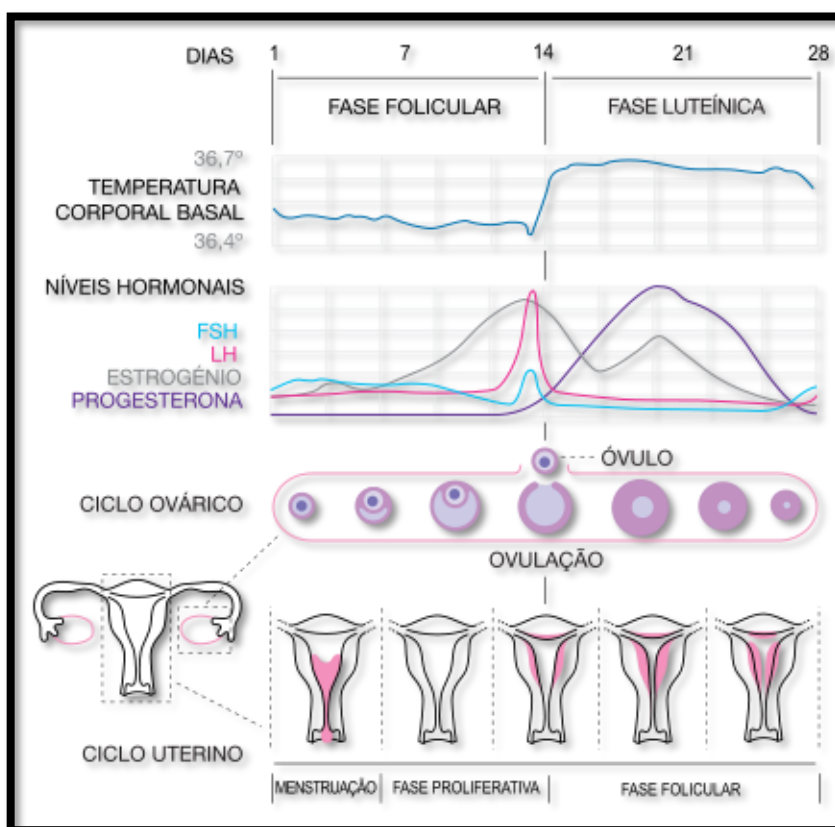


FIGURA 14: CICLO MENSTRUAL E RESPECTIVAS FASES, ADAPTADO:
[HTTPS://PT.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/CICLO_MENSTRUAL#/MEDIA/FILE:MENSTRUALCYCLE2_PT.SVG](https://pt.wikipedia.org/wiki/Ciclo_menstrual#/media/File:MenstrualCycle2_PT.svg) (ACEDIDO A 20 MAIO)

A fase folicular envolve o crescimento e/ou proliferação do revestimento uterino [136]. Esta fase é dependente da hormona folículo-estimulante (FSH) a qual é responsável pela estimulação de alguns dos folículos ovarianos. Durante o ciclo menstrual, apenas um folículo, o folículo dominante, conclui a maturação passando a designar-se, folículo de Graaf. [137]

Com o amadurecimento dos folículos, estes vão segregando quantidades cada vez maiores de estrogénio, induzindo o desenvolvimento do endométrio proliferativo [136]. A ovulação ocorre após a fase folicular, e compreende a maturação do folículo no ovário, e a libertação do óvulo nas trompas de falópio [137].

A fase luteínica é a última fase do ciclo menstrual. Neste período, o corpo lúteo formado no ovário depois do óvulo ser libertado na trompa de Falópio por estímulos das hormonas pituitárias, FSH e LH (hormona luteinizante), vai produzir quantidades significativas de progesterona. A progesterona é fundamental para a recetividade do endométrio e nidação do blastocisto [136].

As hormonas produzidas pelo corpo lúteo também suprimem a produção de FSH e LH de que o corpo lúteo necessita. Consequentemente, os níveis de FSH e LH decrescem rapidamente, fazendo com que o corpo lúteo atrofie. A queda dos níveis de progesterona ativa a menstruação e o início do ciclo seguinte [137].

Decidualização

No decorrer do ciclo menstrual, o endométrio é exposto a grandes mudanças relativamente à remodelação celular, nomeadamente proliferação, diferenciação e aumento da atividade secretora e regressão por apoptose [136]. Após a ovulação ocorre a transformação dos fibroblastos do estroma uterino em células especializadas, designadas de células deciduais, num processo designado de decidualização, que permite a implantação do blastocisto numa eventual gravidez [136].

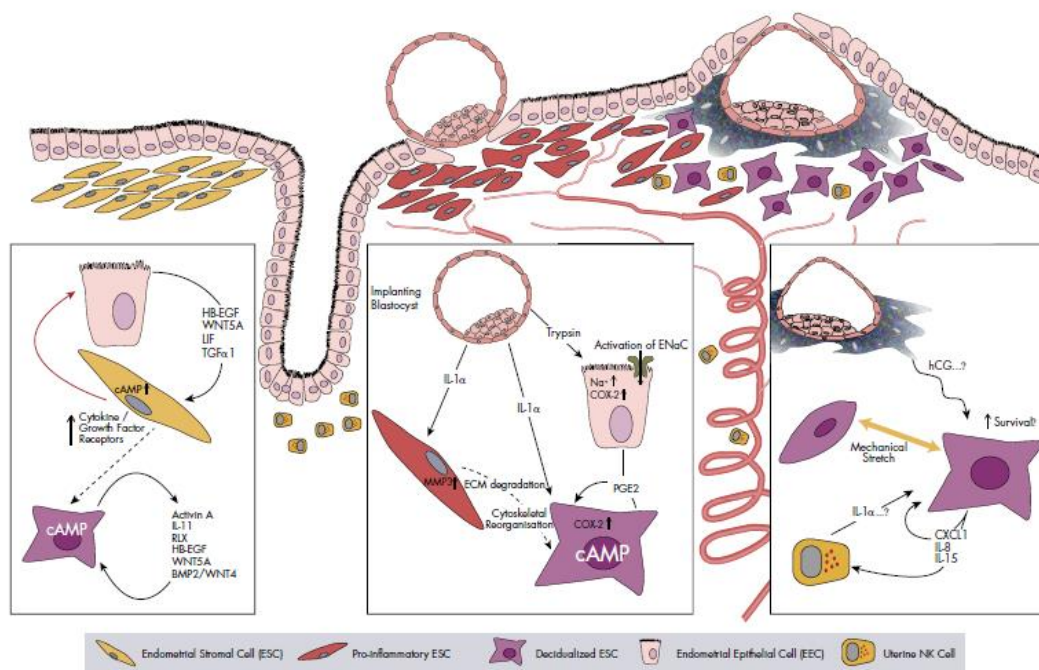


FIGURA 15: IMAGEM ESQUEMÁTICA DE INPUTS REGULATÓRIOS (PARÁCRINOS E AUTÓCRINOS) QUE LEVAM A DECIDUALIZAÇÃO. (136)

A decidualização é um processo que resulta em mudanças morfológicas e funcionais significativas no endométrio, essencialmente nas células do estroma endometrial (ESC), (Figura 15). Paralelamente, denota-se nesta fase do ciclo, a presença leucócitos deciduais e alterações vasculares nas artérias maternas [136].

Uma vez iniciado o processo de decidualização, as células vão passar por processos de inflamação aguda, correspondente ao seu fenótipo inicial, para um estado não inflamatório e secretor. O processo inflamatório das células deciduais coincide com o período de receptividade que permite uma comunicação molecular entre a mãe e o embrião (Figura 15) [136].

As células deciduais produzem marcadores bioquímicos específicos como a prolactina e o IGFBP-1 (proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina). A produção de prolactina relaciona-se positivamente com o tamanho e desenvolvimento das células deciduais [137]. Esta hormona é ainda responsável pelo desenvolvimento e invasão dos trofoblastos, promoção de angiogénese e prevenção da rejeição pelo sistema imunitário materno [138]. Outro produto decidual é a proteína IGFBP-1 anteriormente conhecida como proteína placentária [139].

A produção de IGFBP-1 é induzida durante a fase secretora após estímulo da progesterona [136]. O pico desta proteína dá-se por volta das 16 semanas de gestação, precedendo o pico de prolactina. O IGFBP-1 é responsável pelo ajuste fisiológico durante a gestação que vai permitindo, consoante necessidade do feto, um aumento de nutrientes disponíveis [140].

Como tal, a prolactina e a IGFBP-1, são ambos influenciados pelos estímulos da decídua e são amplamente utilizados como marcadores para avaliar o estado de diferenciação dos HESCs em meios de cultura [136].

A decídua tem como papel fundamental a regulação da invasão dos trofoblastos, processo que leva ao desenvolvimento da placenta hemocorial, que permite o contacto direto entre o sangue materno e o feto [141]. Também desencadeia a produção de fatores celulares e moleculares que resultam na remodelação das artérias espiraladas maternas [136]. No caso de nenhum embrião ser implantado, a decídua é eliminada [136].

Correlação com o BPA

Estudos epidemiológicos demonstram que a exposição do BPA está associada ao aborto espontâneo recorrente e ao aparecimento de patologias reprodutivas como endometriose, ovário poliquístico e hiperplasia endometrial [142-144].

Um outro estudo descreve o efeito inibitório do BPA na diferenciação e na viabilidade das células do endométrio. Mesmo em concentrações não tóxicas, o BPA altera a expressão dos recetores de estrogénio. Também concluíram que o BPA leva a uma desregulação multi-alvo das células deciduais, em concentrações comumente detetadas na população humana, o que leva a concluir as possíveis consequências da exposição ao BPA e respetivos problemas na decidualização que por sua vez afetará a possibilidade gravidez [145].



2: Parte Experimental

Materiais e Métodos

Reagente e padrões

Todos os padrões de bisfenóis – bisfenol A (BPA; 99% pureza), bisfenol B (BPB; 98% pureza), bisfenol S (BPS; 98% pureza), bisfenol F (BPF; 98% pureza), bisfenol E (BPE; 98% pureza), bisfenol AF (BPAF; 98% pureza), bisfenol Z (BPZ; 99% pureza) – foram adquiridos à Sigma-Aldrich; O d16bisfenol A (BPA_{d16}; 98 atom% D) usado como padrão interno também foi adquirido à Sigma-Aldrich.

As concentrações utilizadas para a preparação de cada nível, para cada bisfenol, estão descritas na tabela 8 em anexo.

Para as culturas celulares, as soluções mãe para cada bisfenol (BPA, BPS e BPF) foram preparadas em etanol, com uma concentração de 1 µg/L.

O solvente utilizado no QuEChERS – acetonitrilo (MeCN) para análise de resíduos de marca Fluka adquirido à Sigma-Aldrich.

O solvente usado no DLLME foi – o tetracloreto de carbono 99% (T4CE) adquirido à Sigma Aldrich e como reagente derivatizantes o anidrido acético (AA) também adquirido à Sigma Aldrich.

Os restantes compostos foram – o metanol (MeOH) *hypergrade* de marca VWR, o sulfato de magnésio anidrido (anidrido MgSO₄; 99.5% pureza) e o n-heptano (cromosov plus para HPLC 99%) ambos adquiridos à Sigma Aldrich – o MgSO₄ foi tratado previamente numa mufla a 500°C para garantir a remoção de algum contaminante.

Soro de bovino fetal (FBS) com antibiótico, antimicótico numa solução de 100 U/mL penicilina G sódio 100 µg/ml, sulfato de estreptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B ; O meio Dulbecco's Modief EAgle Medium- F12 (DMEM-F12) e tripsina foram adquiridos da Gibco/Invitrogen Corporation, CA, USA.

Os reagentes da secção biológica foram o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), a Sulfarodamina B (SRB) e o Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), todos estes adquiridos à Sigma-Aldrich Co, Mo, USA

Linha celular St-t1B

A linha celular utilizada nesta dissertação foi a St-t1B, sendo esta constituída por células do estroma endometrial primário, fibroblastos, que foram isoladas de um paciente de 30 anos e transformadas por uma introdução estável do recetor para retrovírus ecotrópicos usando seleção por neomicina com uma sequência que codifica hTERT e selecionado para resistência à higromicina. As células St-t1B adquirem um fenótipo decidual em resposta à estimulação com AMPc, com modo de crescimento aderente [146].



2.1: Parte Experimental – Secção Químico Analítica

Procedimento analítico total

O procedimento de extração por QuEChERS foi realizado de acordo com procedimento analítico abaixo descrito e ilustrado na figura 16:

- (1) Pesar 10 g de amostra homogeneizada e triturada para um frasco de 40 mL de vidro,
- (2) Adicionar 100 µL de solução de trabalho BPAd (IS) 2 µg/kg,
- (3) Adicionar 2,5 mL de n-heptano (2 vezes) e 10 mL de água desionizada,
- (4) Centrifugar 3 min a 3500 g,
- (5) Rejeitar a camada superior (gordura+n-heptano),
- (6) Adicionar 10 mL de MeCN e 4 g de MgSO₄ anidro,
- (7) Agitar durante 15 minutos,
- (8) Centrifugar 2 min a 3500 g,
- (9) Retirar 1,25 mL do sobrenadante (extracto de MeCN) para um frasco de 4mL (de vidro) e posteriormente adicionar 50 mg de C18 e 50 mg de z-sept,
- (10) Centrifugar 1 min a 3500 g,
- (11) Retirar 1 mL de sobrenadante e transferir para um frasco de 4 mL.

O procedimento (concentração e derivatização) DLLME foi realizado de acordo com procedimento analítico descrito e ilustrado com a figura 16:

- (1) Adicionar a 1mL de extrato obtido no QuEChERS a solução de K₂CO₃ a 25%, até pH≥10,
- (2) Adicionar 80 µL de T4CE e 100 µL de anidrido acético,
- (3) Transferir rapidamente a mistura para um tubo de vidro de tampa roscada de 25 mL com fundo cónico contendo previamente 4 mL de água desionizada,
- (4) Fechar o tubo e agitar manualmente por 30 s,
- (5) Centrifugar 2 min a 3500 g,

(6) Transferir 50 μL da fase inferior para um frasco de injeção de 100 μL e injetar 1 μL da solução extraída no sistema GC-MS.

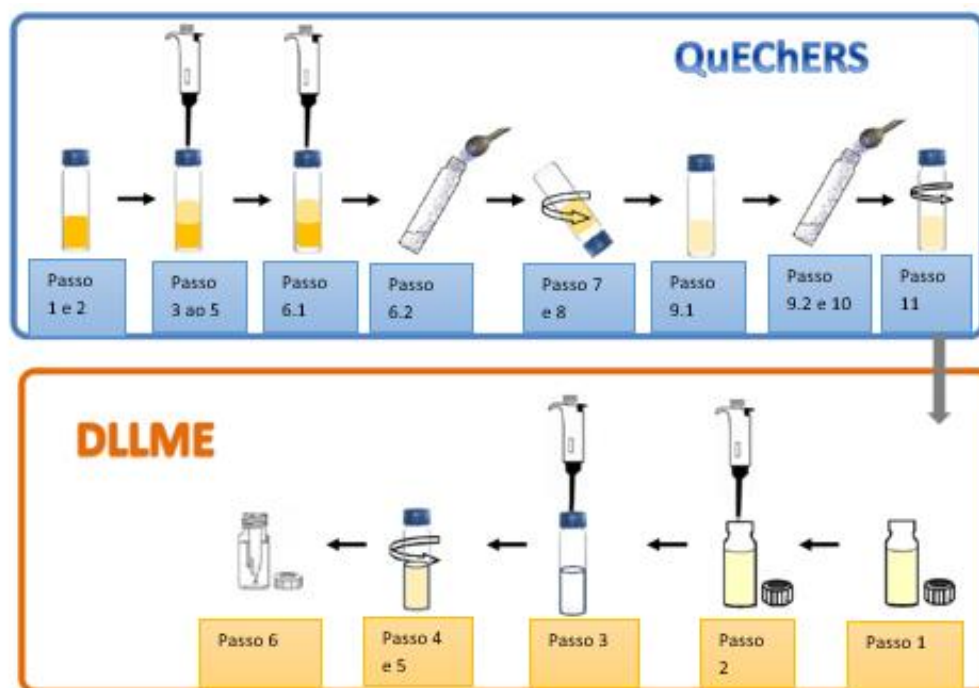


FIGURA 16: IMAGEM ILUSTRATIVA DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO (QuEChERS) E CONCENTRAÇÃO (DLLME), ADAPTADO DE CUNHA ET AL (2012)

A separação e quantificação dos compostos analisados foi realizada usando a cromatografia gasosa- espectrometria de massa (Agilent GC-6890-MSD 5973N). Usou-se uma coluna J&W (30m \times 0.25 μm , 0.25mm I.D.), a temperatura de injeção foi de 280 $^{\circ}\text{C}$, o fluxo de hélio de 1.0 mL/min constante e o volume de injeção de 1 μL . O programa de gradiente de temperatura foi o seguinte: 100 $^{\circ}\text{C}$ (1 min); 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até atingir os 280 $^{\circ}\text{C}$ (10 min).

O espectrômetro de massa operou com as seguintes temperaturas – linha de transferência: 280 $^{\circ}\text{C}$; fonte de íões: 230 $^{\circ}\text{C}$; quadrupolo: 150 $^{\circ}\text{C}$ –

Os dados foram tratados com o Software Chemstation da Agilent. A quantificação foi efetuada no modo seletivo de íões para identificação dos compostos, com base nos íões de confirmação e no íão quantificador já conhecidos da literatura, conforme tabela 2.

TABELA 2: PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DOS BISFENÓIS ESTUDADOS

BPs	MM	TR	Ião Quant.	Iões Conf.				
BPAF	336,2	7,23	336	420	267	359	197	
BPF	200,2	7,91	242	284	200	152	107	
BPE	214,3	8,11	214	256	298	199	241	
BPA _d	244,4		224	242	284	266	326	
BPA	228,3	8,33	213	228	255	270	312	
BPB	242,3	8,74	213	255	297	281	326	
BPS	250,3	10,37	250	334	292	141	186	110
BPZ	268,4	11,09	310	352	268	225	251	

MM (MASSA MOLECULAR); TR (TEMPO DE RETENÇÃO); IÃO QUANTIFICADOR; IÃO DE CONFIRMAÇÃO

Quantificação

Para a quantificação dos bisfenóis em estudo, por GC-MS construíram-se curvas de calibração a partir de soluções padrão em matriz preparadas com a adição nas amostras escolhidas de oito níveis diferentes (Tabela 8). As amostras de carne utilizadas para a construção das curvas de calibração estavam embaladas em frascos de vidro, tendo sido sujeitas a um tratamento igual ao das restantes amostras analisadas. O P.I. utilizado foi o BPA_d numa concentração de 2 µg/kg.

As amostras estavam contidas em embalagens de vidro para ficarem o mais isentas possível de contaminação por parte dos bisfenóis.

Foram construídas 3 curvas de calibração:

- I. Em água
- II. Em amostra de salsichas
- III. Em amostra de patés

Dada a impossibilidade de se ter refeições pré-feitas à base de carne isentas de bisfenóis e dado que o seu teor em lípidos é semelhante ao das salsichas optou-se por usar a curva de calibração feita a partir de salsichas para quantificar os teores de bisfenóis nas refeições pré-feitas. A curva de calibração feita a partir de paté serviu exclusivamente para a análise dos patés.

Otimização do método

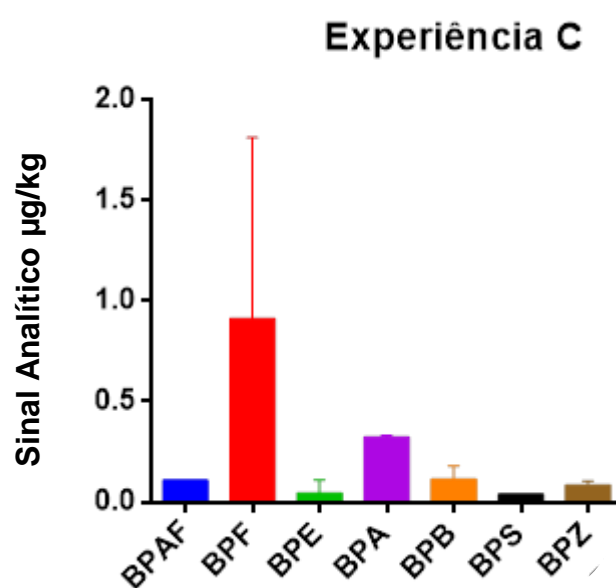
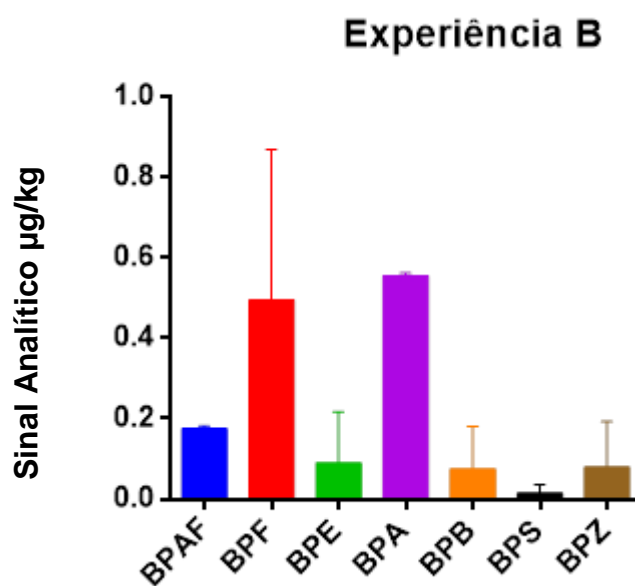
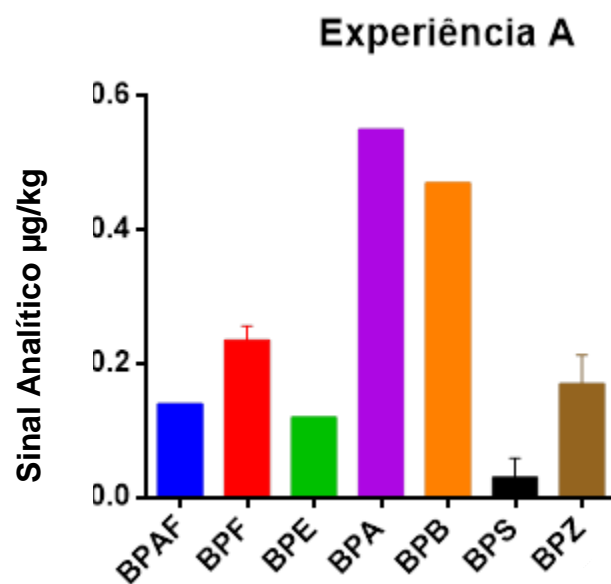
Como já foi referido o bisfenol está presente em embalagens de plástico. Como tal, para evitar contaminação das amostras os materiais utilizados foram exclusivamente de vidro, previamente tratados na mufla por cerca de 2h a 500°C. A água utilizada foi água ultrapura para eliminar possíveis contaminantes. Só após a análise desta água ter sido consecutivamente negativa para todos os bisfenóis é que se procedeu à análise das amostras, de modo a evitar falsos positivos.

Otimização das condições de extração

Uma vez que as amostras a analisar eram ricas em gordura, tentou-se otimizar a remoção de gorduras por duas vias distintas. Para tal, procedeu-se ao tratamento das amostras com n-heptano ou n-hexano antes da extração (QuEChERS). Após estas experiências avaliou-se ainda a quantidade de amostra - 5 ou 10g - de forma a avaliar se a diminuição de amostra contribuiria para a diminuição de interferentes (gorduras) no extrato.

Para isto procedeu-se à realização de 3 protocolos distintos, abaixo assinalados, com a prévia adição de bisfenóis com uma concentração de 10 µg/kg (Tabela 8 em anexo) à amostra nº3 (Tabela 9 em anexo) e, após o QuEChERS, adicionou-se o BPAd numa concentração de 2 µg/kg.

Experiência A: 10g de amostra inicial e 5 mL de n-heptano; Experiência B: 10g de amostra inicial e 5 mL de n-hexano; Experiência C: 5g de amostra inicial e 2,5 mL de n-heptano.



FIGURAS 17 : SINAL ANALÍTICO DE CADA BISFENOL COM O MÉTODO DE LIMPEZA UTILIZADO; EXPERIENCIA A : 10G DE AMOSTRA + 5ML DE N-HEPTANO; EXPERIENCIA B : 10 G DE AMOSTRA + 5 ML DE N-HEXANO; EXPERIENCIA C : 5G DE AMOSTRA + 2,5 ML DE N-HEPTANO.

Como é perceptível pela análise dos gráficos referentes às experiências A e B (Figura 17) obteve-se, de uma forma geral, um maior sinal analítico para cada bisfenol com a experiência A (utilização de 5 mL de n-heptano e 10 g de amostra).

Comparando os gráficos referentes às experiências A e C (Figura 17) foi também possível concluir que a experiência A permitia a obtenção de uma resposta analítica superior à da experiência C.

Após esta avaliação o protocolo referente à experiência A (10g de amostra inicial + 5 mL de n-heptano) foi o escolhido uma vez que permitia uma remoção de gordura eficiente com o melhor sinal analítico.

Adicionalmente, procedeu-se a uma otimização do processo de limpeza do QuEChERS com a utilização de alguns sorbentes descritos na literatura com elevada eficiência para a remoção de gordura. Para o efeito utilizou-se a amostra nº 5 (Tabela 9 em anexo), uma amostra de paté, à qual foi adicionado uma concentração de 5 µg/kg (correspondente ao nível 7, tabela 8 em anexo) antes do processo extrativo (QuEChERS).

Os extratos obtidos na fase inicial do QuEChERS, cerca de 1,3 mL, foram tratados com uma mistura de 50 mg de C18 e 50 mg de Z-sept e uma mistura de 50 mg de C18 e 50mg de carvão ativado. Estes ensaios foram realizados em triplicado, com a adição do BPA_d numa concentração de 2 µg/kg no fim do QuEChERS, antes do procedimento DLLME.

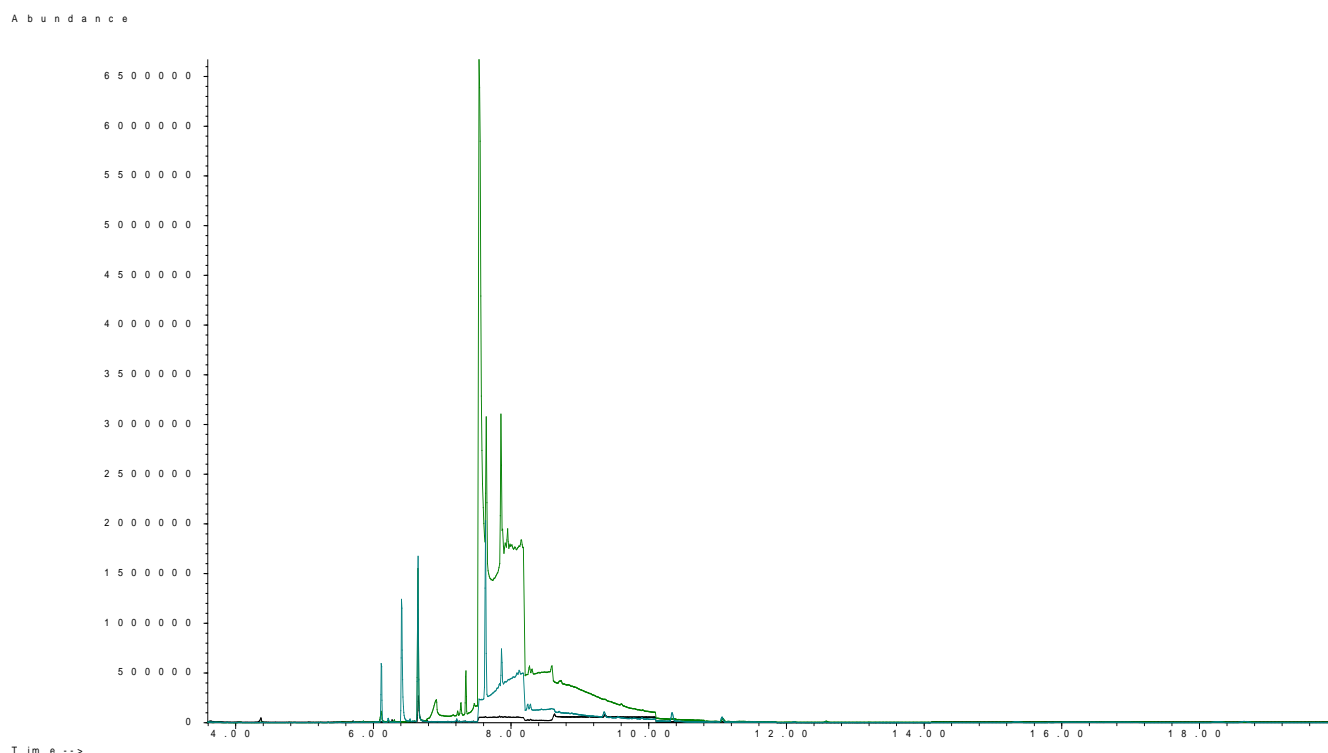


FIGURA 18: CROMATOGRAMAS SOBREPOSTOS DAS ANÁLISES DOS EXTRATOS OBTIDOS COM I) TRATAMENTO C18 + Z-SEPT II) COM TRATAMENTO C18 + CARVÃO ATIVADO III) SEM TRATAMENTO; PARA OS 7 BISFENÓIS ESTUDADOS EM CONCENTRAÇÃO DE 5µG/KG

I) CROMATOGRAMA DE COR AZUL; II CROMATOGRAMA DE COR PRETA; III CROMATOGRAMA DE COR VERDE

Como se pode verificar pela análise dos perfis cromatográficos (Figura 18) obtiveram-se diferentes cromatogramas para os diferentes tipos de tratamento utilizados.

O cromatograma respectivo ao ensaio realizado com o tratamento de C18 + carvão ativado, comparativamente com o cromatograma do ensaio realizado sem tratamento, apresentou uma diminuição da linha de base significativa, tendo existido contudo uma supressão do sinal analítico.

O cromatograma correspondente ao tratamento de C18 + Z-sept comparativamente ao cromatograma sem tratamento apresentou uma diminuição da linha base sem grande diminuição do sinal analítico.

Os dois cromatogramas com tratamento apresentaram uma diminuição da linha de base comparativamente ao cromatograma sem tratamento, tendo existido todavia perda do sinal analítico no cromatograma correspondente ao tratamento com C18 + carvão ativado.

Assim, concluiu-se que o mais eficaz para remoção de lípidos dos extratos seria o tratamento com 50 mg de C18 + 50mg de Z-sept.

Validação do método

A validação dos métodos analíticos é uma parte essencial no trabalho experimental, de modo a provar-se que de facto o método analítico utilizado é capaz de produzir resultados precisos e exatos no âmbito do seu uso pretendido. A validação foi concebida através da análise de diferentes parâmetros analíticos como a linearidade, precisão intradiária e interdiária, exatidão (através dos níveis de recuperações obtidos), Limite de Detecção (LODs) e Limite de Quantificação (LOQs).

O método de calibração adotado foi o método do padrão interno, que visa a utilização de uma referência com características similares à do analito. O valor da resposta corresponde à razão entre o sinal do analito e o sinal do padrão interno; neste caso o padrão interno utilizado foi o BPA_d. Este método permitiu compensar determinados efeitos que influenciem tanto o analito (os bisfenóis) como a referência (o BPA_d), com a mesma intensidade.

Linearidade

A linearidade é a proporcionalidade da resposta analítica em função da concentração da substância na amostra. Esta é medida pelo coeficiente de correlação (r), sendo considerada tanto melhor quanto mais próximo da unidade [147].

O efeito da matriz pode afetar a “performance” cromatográfica, pelo que se procedeu à comparação das curvas de calibração obtidas em água com aquelas obtidas a partir das amostras de salsichas e de patés em frascos de vidro. Estes frascos eram de vidro de modo a evitar contaminações na amostra por parte da embalagem com intuito de obtenção de curvas de calibração mais fidedignas possíveis.

TABELA 3: CURVAS DE CALIBRAÇÃO E RESPECTIVO COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO, OBTIDOS PARA CADA UM DOS BISFENÓIS NOS TRÊS TIPOS DIFERENTES DE MATRIZ.

Matriz	BPs	Equação	Coeficiente de determinação (R ²)
Salsichas	BPAF	$y = 0,1459x + 0,0812$	$R^2 = 0,9425$
	BPF	$y = 0,2089x - 0,038$	$R^2 = 0,9886$
	BPE	$y = 0,1849x + 0,0376$	$R^2 = 0,9609$
	BPA	$y = 0,2143x + 0,3508$	$R^2 = 0,9958$
	BPB	$y = 0,1009x - 0,0335$	$R^2 = 0,9573$
	BPS	$y = 1,1077x + 0,4759$	$R^2 = 0,9772$
	BPZ	$y = 0,2046x + 0,1856$	$R^2 = 0,9741$
Patés	BPAF	$y = 0,1459x + 0,0812$	$R^2 = 0,9608$
	BPF	$y = 0,2089x - 0,038$	$R^2 = 0,9821$
	BPE	$y = 0,1849x + 0,0376$	$R^2 = 0,9234$
	BPA	$y = 0,2143x + 0,3508$	$R^2 = 0,9271$
	BPB	$y = 0,1009x - 0,0335$	$R^2 = 0,9730$
	BPS	$y = 1,1077x + 0,4759$	$R^2 = 0,9592$
	BPZ	$y = 0,2046x + 0,1856$	$R^2 = 0,9186$
Água	BPAF	$y = 0,0063x + 0,0003$	$R^2 = 0,9734$
	BPF	$y = 0,0043x + 0,002$	$R^2 = 0,9571$
	BPE	$y = 0,0051x + 0,0022$	$R^2 = 0,9849$
	BPA	$y = 0,0068x + 0,0032$	$R^2 = 0,9910$
	BPB	$y = 0,0032x + 0,0003$	$R^2 = 0,9547$
	BPS	$y = 0,0089x - 0,0062$	$R^2 = 0,9798$
	BPZ	$y = 0,0166x - 0,0029$	$R^2 = 0,9813$

As curvas de calibração foram preparadas em sextuplicado em oito níveis de concentração (0; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10 µg/kg) (Tabela 8). Cada curva de calibração foi construída através da relação entre a área da substância e a área do P.I.,

em função da concentração; o P.I. foi adicionado no início do processo de extração (QuEChERS) numa concentração de 2 µg/kg. (Tabela 3)

Verifica-se pelos resultados obtidos na tabela 3 que se obteve uma linearidade com valor de r^2 superior a 0.91 para cada um dos bisfenóis nos diferentes tipos de matriz. Como seria de esperar o coeficiente de determinação é mais alto (melhor) na matriz aquosa uma vez que não teve interferências de gorduras, contrariamente às outras duas matrizes. Como seria de esperar a matriz de paté foi a matriz na qual se observaram menores valores de coeficiente de determinação graças ao seu maior teor de gordura.

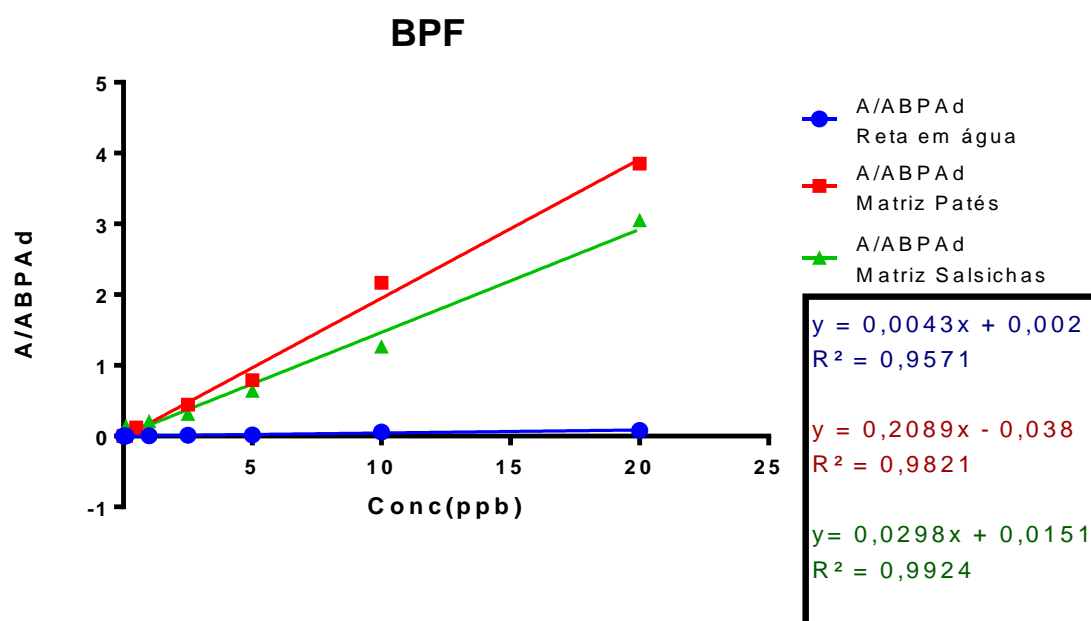


FIGURA 19: DIFERENTES CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA O BPF CONSOANTE O TIPO DE MATRIZ

As curvas de calibração obtidas para o mesmo bisfenol, com as diferentes matrizes, apresentaram declives muito distintos, como se pode observar na figura 19, para o caso do BPF.

A curva de calibração em água possui um declive muito inferior aos declives obtidos com as amostras de paté e de salsichas. Isto sugere um efeito de matriz das amostras utilizadas, em que se observa um aumento de sinal, existindo todavia, como já foi referido, uma menor linearidade (r^2).

Precisão

A precisão é o grau de concordância dos resultados obtidos numa série de análises de uma mesma amostra, sendo avaliada pela reprodutibilidade do método [147].

Para tal efetuou-se a análise de uma amostra (amostra nº3, tabela 9 em anexo) de acordo com a metodologia desenvolvida, nas mesmas condições analíticas, contemplando o intervalo linear do método para as três concentrações definidas sendo estas 0,5 µg/kg, 2,5 µg/kg e 10 µg/kg (Tabela 8). A adição de BPA_d foi feita após o QuEChERS numa concentração de 2 µg/kg.

Para termos a % de precisão, com os resultados obtidos calculou-se uma média e um desvio padrão para cada um dos níveis e multiplicou-se por 100 (Tabela 4).

Os resultados obtidos foram satisfatórios com uma média de coeficiente de variação (CV) inferior a 19% para todos os resultados obtidos intradiariamente.

Os ensaios interdiários foram realizados em três dias consecutivos e distanciados cerca de um mês após os ensaios intradiários. Nos ensaios interdiários obteve-se uma média de CV um pouco superior correspondente a 28%.

TABELA 4: VALOR DE PRECISÃO INTRADIÁRIO E INTERDIÁRIO DO MÉTODO OTIMIZADO

Bisfenóis	Concentrações Intra			Con. Inter
	0,5 µg/kg	2,5 µg/kg	10 µg/kg	10 µg/kg
	CV %	CV %	CV %	CV %
BPAF	28%	21%	19%	29%
BPF	21%	11%	14%	31%
BPE	9%	7%	16%	38%
BPA	12%	28%	16%	17%
BPB	13%	28%	9%	19%
BPS	16%	25%	18%	33%
BPZ	14%	18%	27%	32%
Média	16%	19%	17%	28%
Des. pad.	±6%	±8%	±5%	±7%

Recuperação

A recuperação é a proporção da quantidade do composto de interesse adicionado na matriz, que é extraído e passível de ser quantificado [147].

Para avaliar a exatidão do método analítico foram realizados testes de recuperação. A recuperação foi determinada por comparação da resposta analítica dos analitos, na amostra nº3 (de acordo com tabela 9 em anexo) enriquecida antes e depois da etapa de extração (QuEChERS) para três níveis de concentração distintos (0,5 µg/kg; 2,5 µg/kg e 10 µg/kg) (Tabela 8), sendo cada nível realizado seis vezes. O BPA_d foi adicionado após o processo de QuEChERS numa concentração de 2 µg/kg.

De um modo geral conseguiu-se uma boa percentagem de recuperação para todos os bisfenóis analisados, com recuperações entre os 57% e os 100%, como se pode ver na tabela 5. Verificou-se também que o nível de concentração de 2,5 µg/kg foi o que permitiu maiores percentagens de recuperação média (87%) comparativamente aos outros dois níveis, 0,5 µg/kg e 10 µg/kg, cujas percentagens de recuperação médias foram 75% e 78 %, respetivamente.

TABELA 5: RECUPERAÇÃO (%) PARA CADA UM DOS BISFENÓIS ANALISADOS, EM TRÊS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DISTINTOS

BFs	Níveis Concentração		
	0,5 µg/Kg	2,5 µg/Kg	10 µg/Kg
	Recuperação	Recuperação	Recuperação
BFAF	79%	85%	79%
BFF	67%	72%	73%
BFE	57%	64%	70%
BFA	95%	95%	75%
BFB	68%	97%	75%
BFS	78%	100%	98%
BFZ	80%	75%	78%
Média	75%	87%	78%

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD) correspondente à menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificado.

A determinação do LOD foi realizada por análises sucessivas de extratos de amostra adicionando quantidades decrescentes dos compostos até atingir uma relação sinal / ruído de 3:1.

O limite de quantificação (LOQ) é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições de análise utilizadas.

Os LOQ foram estabelecidos como a concentração mais baixa analisada com uma relação sinal / ruído de 10:1.

Para os bisfenóis em estudo o LOD variou entre 0,015 e 0,030 µg/kg e o LOQ variou entre 0,05 e 0,10 µg/kg (Tabela 6).

TABELA 6: O LOD E LOQ (µg/KG) PARA TODOS OS BISFENÓIS ESTUDADOS

Bisfenóis	Limite Detecção	Limite Quantificação
BPAF	0,030	0,10
BPF	0,015	0,05
BPE	0,015	0,05
BPA	0,015	0,05
BPB	0,015	0,05
BPS	0,015	0,05

Aplicação da metodologia desenvolvida

As amostras à base de carne foram escolhidas aleatoriamente nos supermercados portugueses, tendo sido selecionadas 30 embalagens de enlatados e embalados de carne. Com base na sua composição as amostras foram divididas em patés, refeições e salsichas.

As amostras foram ainda divididas de acordo com o tipo de marca – marca comercial ou marca branca – e com a sua origem (França, Espanha e Portugal), de acordo com a tabela 9 em anexo.

Abaixo estão representados os resultados obtidos para cada um dos bisfenóis sob a forma de gráfico de barras (Figuras 20-27).

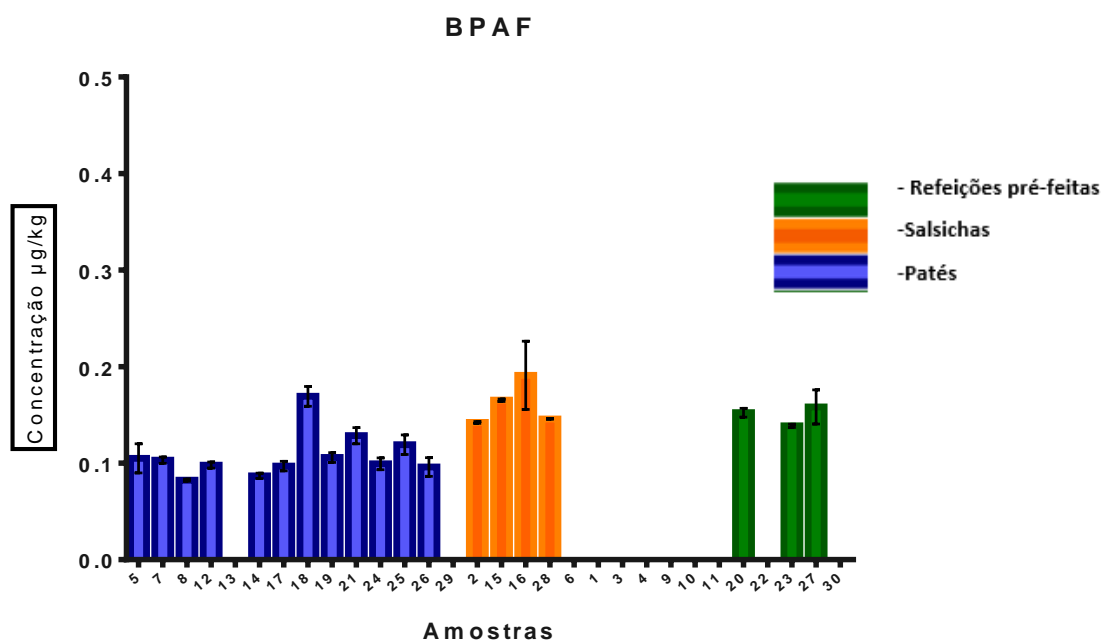


FIGURA 20: NÍVEIS DE BPA F NAS AMOSTRAS ANALISADAS

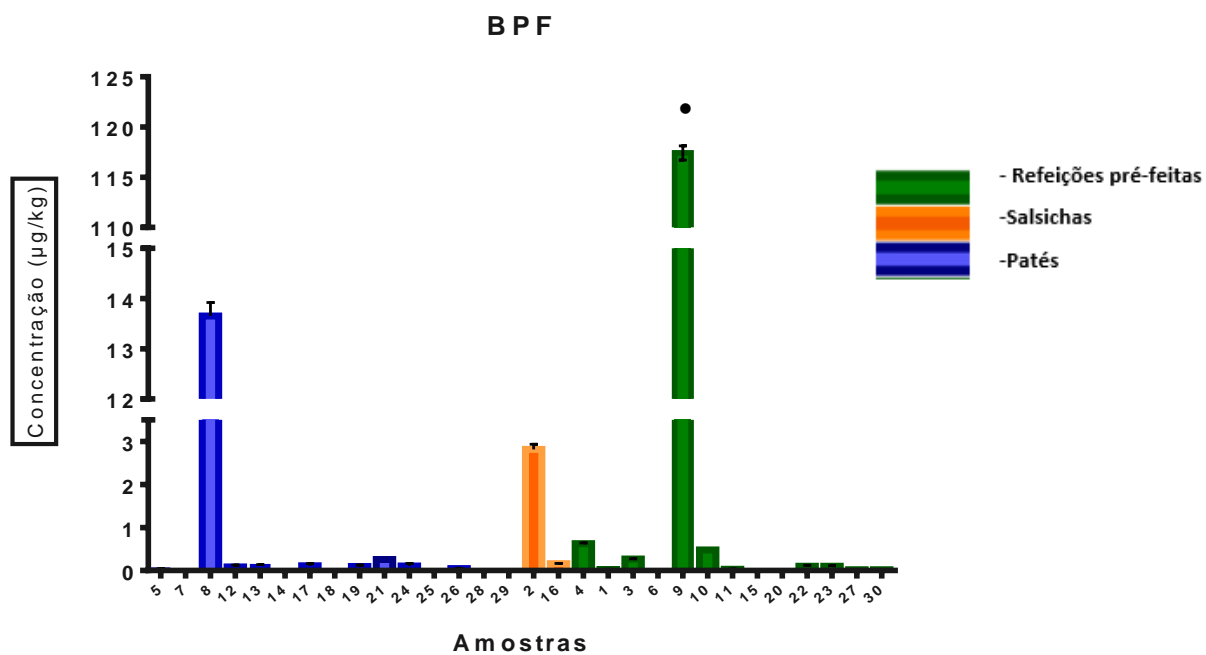


FIGURA 21: NÍVEIS DE BFE NAS AMOSTRAS ANALISADAS

• : Valor acima do alcance da curva de calibração

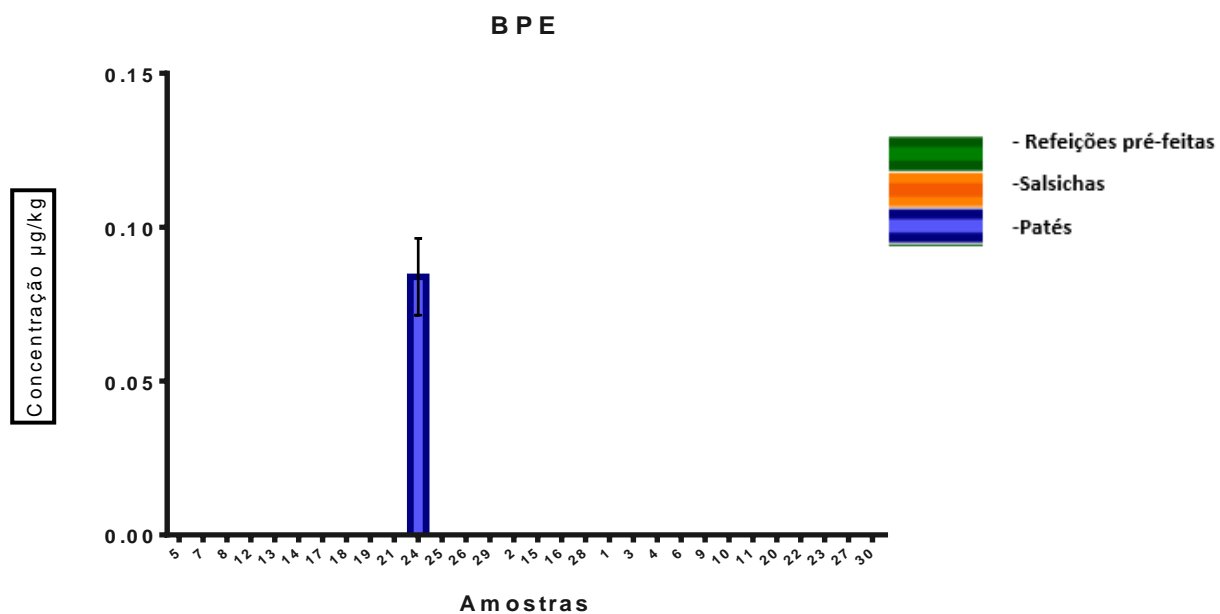


FIGURA 22: NÍVEIS DE BPF NAS AMOSTRAS ANALISADAS

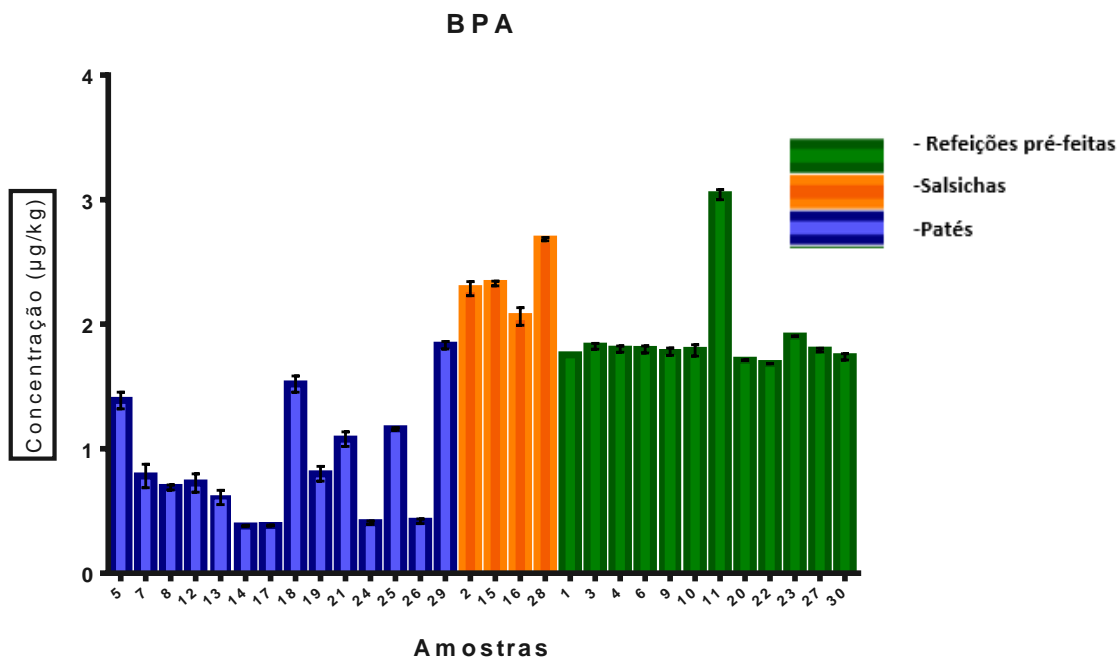


FIGURA 23: NÍVEIS DE BPA NAS AMOSTRAS ANALISADAS

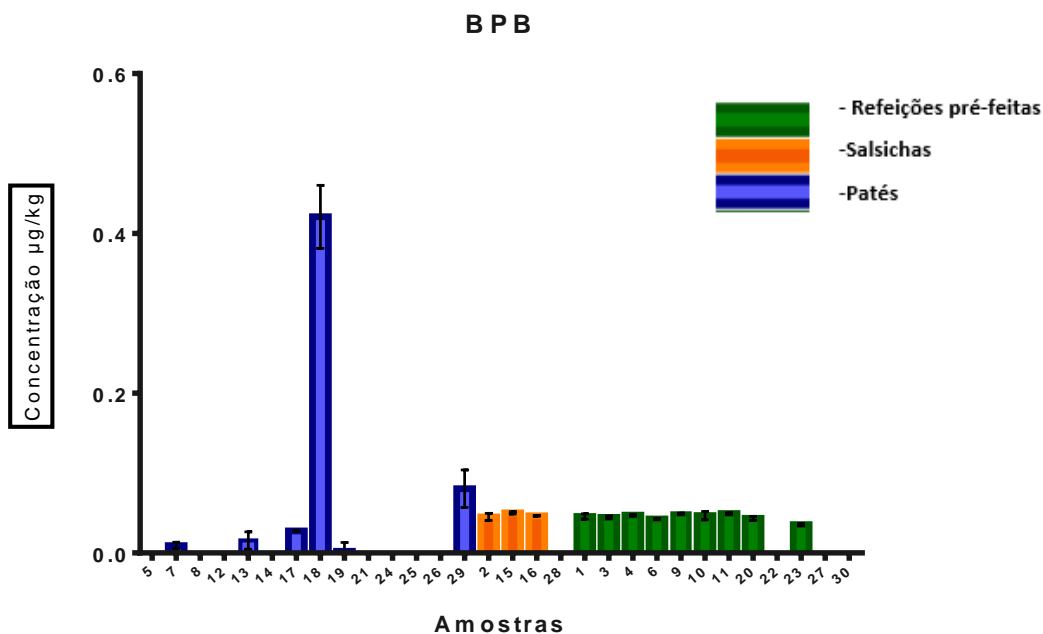


FIGURA 24: NÍVEIS DE BPB NAS AMOSTRAS ANALISADAS

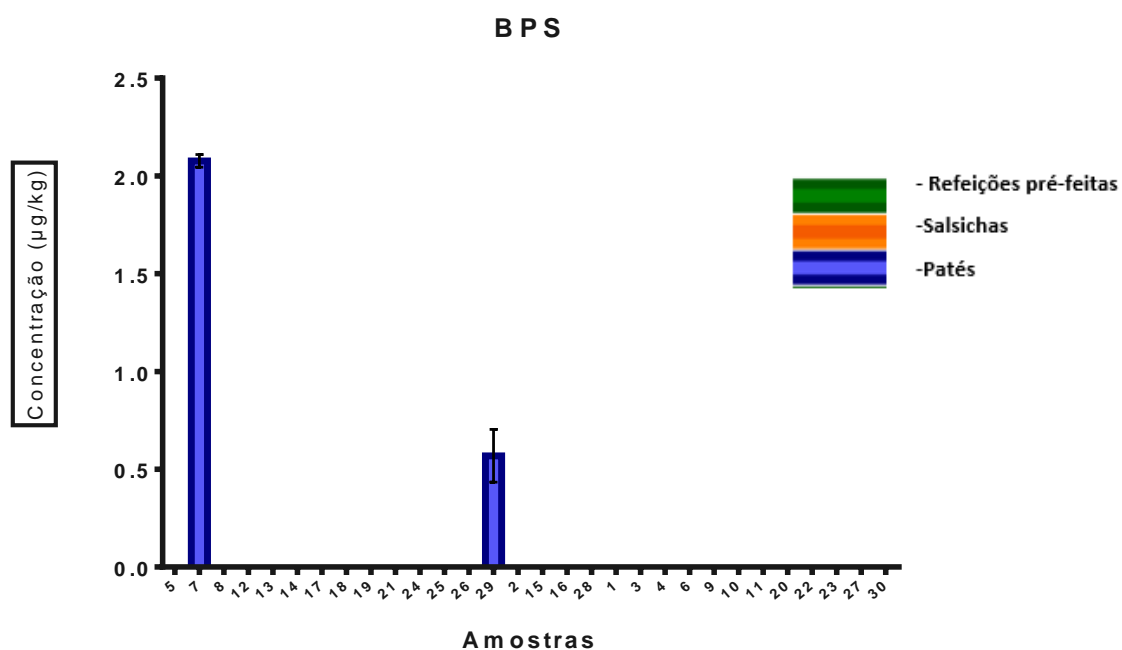


FIGURA 25: NÍVEIS DE BPS NAS AMOSTRAS ANALISADAS

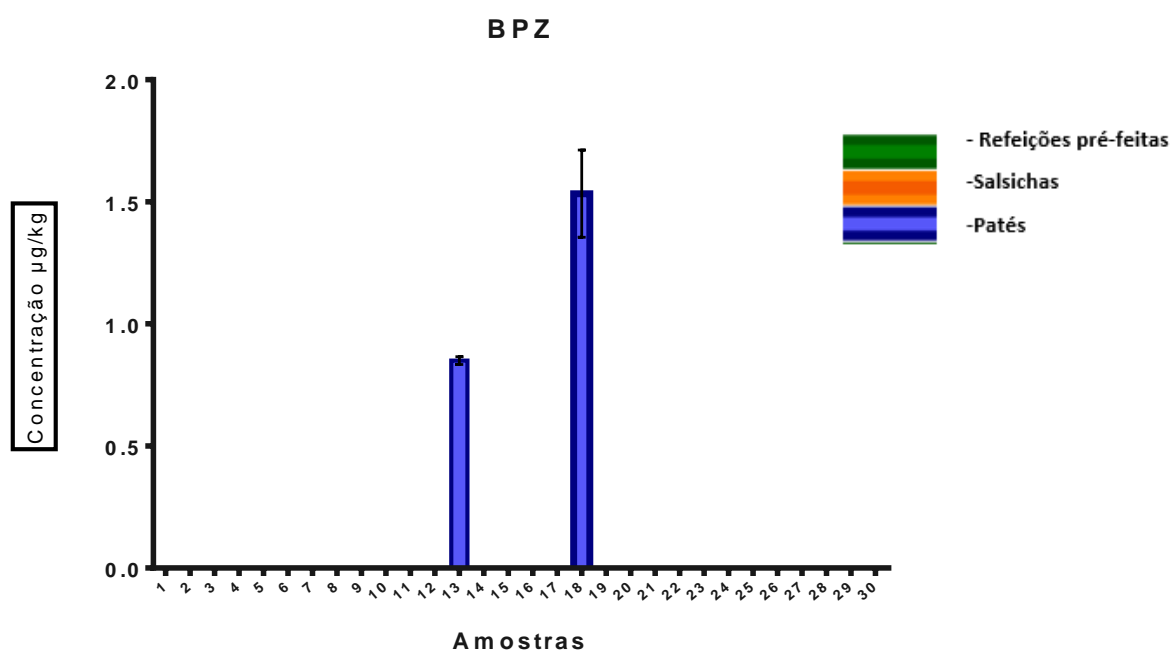


FIGURA 26: NÍVEIS DE BPZ NAS AMOSTRAS ANALISADAS

Discussão dos resultados obtidos

TABELA 7: RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA CADA UM DOS BISFENÓIS NAS AMOSTRAS ANALISADAS

	BPAF	BPF	BPE	BPA	BPB	BPS	BPZ
Total amostras com o analito	19	21	1	30	20	2	2
Total de amostras	30	30	30	30	30	30	30
% Ocorrência	63%	70%	3%	100%	67%	7%	7%
Mínimo	0,082	0,017	0,084	0,382	0,002	0,569	0,850
Média	0,125	6,532	0,084	1,475	0,073	1,323	1,191
Máximo	0,191	117,421	0,084	3,040	0,421	2,077	1,533
Mediana	0,119	0,106	0,084	1,725	0,046	1,323	1,191
Desvio padrão	0,032	25,581	0,000	0,704	0,097	1,066	0,484

Nas 30 amostras embaladas e enlatadas de carne sujeitas a análise – salsichas (4) ; patés (14) ; refeições (12) - foi detetada a presença de todos os analitos em estudo, com maior prevalência para o BPA. O número respetivo de cada amostra encontra-se assinalado na tabela 9 em anexo.

No caso do BPA, verificou-se a sua presença em todas as amostras analisadas, tendo a sua concentração máxima e mínima sido de 3.04 µg/kg e de 0.38 µg/kg (Tabela 7), respetivamente. A amostra 11 (refeição de frango ao natural) foi a amostra que apresentou o maior teor de BPA enquanto que a amostra 14 (paté de frango) foi a que apresentou um teor mais baixo.

Comparativamente com a literatura, os níveis de BPA encontrados foram inferiores aos reportados por *Noonan et al (2011)* em amostras de carne enlatada, em 78 amostras recolhidas nos supermercados dos Estados Unidos, estando estas concentrações compreendidas entre 13 µg/kg e 46 µg/kg [148].

Anteriormente *Thomson et al (2005)*, concluíram que na Austrália, as 80 amostras de carnes enlatadas estudadas continham valores desde os 29 µg/kg até valores inferiores a 10 µg/kg, não especificando o seu valor exato. [149]

Mais recentemente *Caballero-Casero et al (2016)* reportaram um teor médio de BPA, em 871 amostras de comida embalada espanhola de 21,2 ng/g, sendo este um valor superior à concentração média de BPA encontrada (1,475 ng/g) [5].

Relativamente ao BPB, verificou-se 67% de ocorrência nas amostras analisadas, com uma concentração mínima de 0,02 µg/kg e máxima de 0,421 µg/kg (Tabela 7). A amostra com a concentração mais elevada foi a amostra 19 e a amostra com a concentração mais baixa foi a amostra 18, ambas patés com teores de gordura semelhantes. A média do teor de BPB obtido nas amostras foi de 0,073 µg/kg sendo muito inferior ao reportado por *Caballero-Casero et al (2016)* em 686 amostras de comida embalada com uma média de 17,4 µg/kg [5].

O BPE foi apenas quantificado em uma das amostras, (amostra 24), sendo o seu valor de 0,084 µg/kg (Tabela 7). *Caballero-Casero et al (2016)* reporta, que o BPE não foi encontrado em nenhuma das suas 16 amostras analisadas. O que pode demonstrar, tanto pelos dados obtidos quer pelos dados na literatura, que este bisfenol está muito pouco presente nas embalagens alimentares [5].

No caso do BPF obteve-se 70% de ocorrência com concentrações máximas e mínimas, respetivamente, de 117,421 µg/kg e 0,017 µg/kg sendo o máximo relativo à amostra 8 e o mínimo à amostra 27, ambas salsichas, com teores de gordura semelhantes (Tabela 7). É de salientar que a concentração máxima de BPF foi um valor muito elevado comparativamente ao valor máximo de BPA (cerca de 40 vezes superior), o que pode ser problemático uma vez que este possui efeitos semelhantes ao BPA (a nível da atividade estrogénica) [37]. A média de concentrações para o BPF foi de 6,523 µg/kg sendo superior ao reportado por *Caballero-Casero et al (2016)* em 641 amostras de comida embalada com uma média de 3,37 µg/kg ([5].

No caso do BPS, este apenas esteve presente em 2 das 30 amostras analisadas, com concentrações de 0,569 µg/kg e de 2,077 µg/kg (amostras 29 e 7), ambas patés com teores de gordura elevados (Tabela 7). A média das concentrações de BPS obtida nas amostras foi de 1,323 µg/kg sendo muito inferior ao reportado por *Caballero-Casero et al (2016)* em 500 amostras de comida embalada com uma média de 6,30 µg/kg [5].

O BPZ teve uma ocorrência igual à do BPS, apenas de 7% (2 amostras), com as concentrações de 0,850 µg/kg e de 1,533 µg/kg, sendo estas amostras de paté (13 e 18), respetivamente (Tabela 7). A concentração média de BPZ foi de 1,191 µg/kg, valor superior ao reportado por *Caballero-Casero et al (2016)* em 474 amostras de comida embalada com uma média de 0.69 µg/kg [5].

No caso do BPAF, este foi encontrado em 63% das amostras analisadas, com teores máximos e mínimos de 0,082 µg/kg e 0,191 µg/kg, respetivamente (Tabela 7). Neste

caso o valor de maior concentração é correspondente ao encontrado na amostra 16 (uma amostra de salsichas) e o valor de menor concentração é corresponde à amostra de paté (nº8). Para o BPAF obteve-se uma concentração média de 0,125 µg/kg valor superior ao reportado por *Caballero-Casero et al (2016)* em 464 amostras de comida embalada de um teor médio de 0,02 µg/kg [5].

Relação entre o consumo diário de BPA e o seu TDI

De modo a poder ser comparada a quantidade de BPA presente nas amostras com o seu TDI de 4µg/kg/dia [61], procedeu-se à determinação da média da concentração de BPA encontrada nas amostras analisadas (1,475 µg/Kg) multiplicando pelo peso médio de um adulto (72kg) e pela ingestão diária (7,9 g), e dividindo por 1000.

Como demonstrado na equação abaixo:

$$\frac{1,475 \times 72 \times 7,9}{1000}$$

Com isto obteve-se um consumo diário de 0,84 µg/Kg/dia, sendo este valor abaixo do atual TDI europeu. O valor de ingestão diária foi baseado na ingestão diária de carne processada espanhola, por falta de valores nacionais [150]. Porém, o BPA está presente em muitas outras embalagens alimentares e embalagens de bebidas (como refrigerantes, bebidas energéticas e cervejas), passíveis de contaminação por parte do BPA. Isto sugere que deverá haver um cuidado adicional para que o consumo diário de BPA não exceda o seu respetivo TDI.



2.2: Parte Experimental – Secção de Âmbito Biológico

Procedimento analítico total

Plaqueamento celular

- Densidade celular de $1,2 \times 10^4$ para placas de 96 poços
- 1. Adição de 2 mL de tripsina/ EDTA (3 minutos na estufa a 37 °C).
- 2. Adição de 2 mL de meio a 10% soro bovino fetal (SBF) (para inativação da tripsina)
- 3. Lavagem com 5 mL de PBS
- 4. Centrifugação do volume total (5 minutos a 4 °C , 360 g)
- 5. Ressuspensão do pellet em meio a 10% (4 mL)
- 6. Contagem do número de células na câmara de Neubauer, (10 µL de células + 10 µL de azul tripano)
- 7. Plaqueamento celular (meio a 10% SBF+ suspensão celular num volume total de 150 µL, placas de 96 poços).
- 8. Após adesão celular, remoção do meio e procede-se ao tratamento.

Tratamento 1

1. Adição de solução de cada bisfenol (BPA, BPS e BPF) em etanol a 4µM após respectivas diluições, nas placas de 96 poços.
2. Triplicados para cada uma das concentrações (1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM) e respetivo triplicado para o controlo.
3. Posterior avaliação de viabilidade celular por MTT e SRB em tratamento de 24h e 48h

Tratamento 2

1. Adição de misturas dos bisfenóis, (BPA+BPS); (BPA+BPF); (BPF+BPS); (BPA+BPS+BPF) com concentrações de 1 µM, em triplicado e respetivo controlo.

Protocolo SRB

Este método depende da propriedade de SRB de se ligar às proteínas sob condições ácidas suaves e, de seguida, pode ser extraído usando condições básicas; assim, a quantidade de corante ligado pode ser usada para saber a quantidade de massa celular, que pode então ser extrapolada para medir a proliferação celular.

1. Remoção do meio e lavagem com PBS
2. Fixação as células com 100 µL de TCA e deixar a 4°C 1h
3. Lavagem 3-5 vezes com PBS e deixar secar completamente
4. Adição 50 µL de SRB, 4% (em 1% de ácido acético), durante 30 minutos
5. Remoção a solução de SRB e lavar com ácido acético 100 µL, 5 vezes
6. Adição 100 µL de tris-base e agitar 5 minutos
7. Leitura de absorvância 540 nm

Protocolo MTT

O ensaio de viabilidade celular de MTT é com base na redução do corante de tetrazolio que é dependente das enzimas oxidoreductase de NAD (P) dependentes de H em grande parte no compartimento citosólico da célula. Portanto, a redução do MTT depende da atividade metabólica celular devido ao fluxo de NAD(P)H.

As células com um metabolismo baixo, reduzem muito pouco o MTT. Em contraste, as células que se dividem rapidamente apresentam altas taxas de redução de MTT.

1. Adicionar 20 µL de MTT, deixar na incubadora pelo menos 1h30
2. Remoção do meio
3. Adição de 200 µL de isopropanol-DMSO (3:1)
4. Leitura de absorvância 540 nm

Resultados e discussão

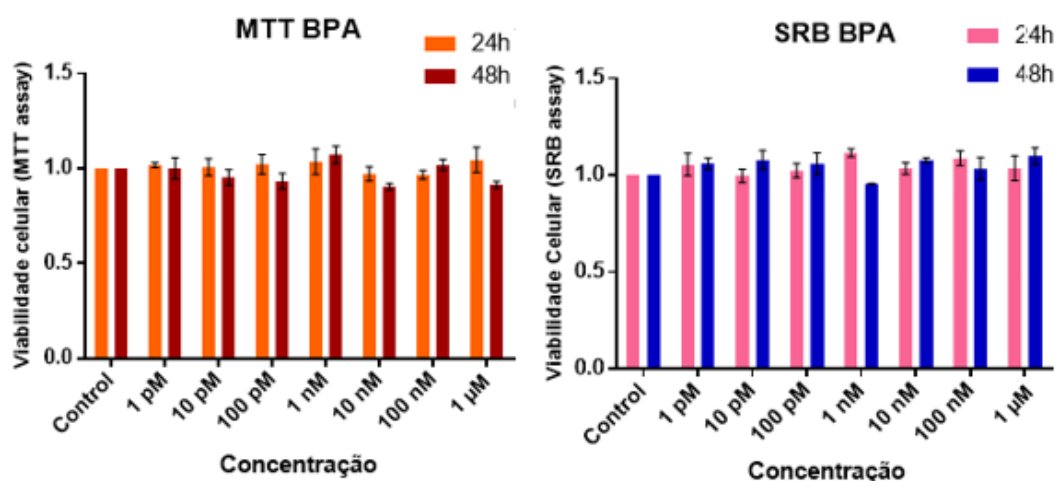
Nesta dissertação, optou-se por se investigar o efeito de três dos bisfenóis que foram identificados nas amostras analisadas, o BPA, o BPS e o BPF, sendo estes também os mais comumente utilizados pelas indústrias. Observou-se ainda que o BPF está presente em concentrações muito superiores aos outros bisfenóis nas amostras de comida analisados [151].

O BPA já foi caracterizado como um desregulador endócrino com respetivo TDI. Assim, este tem vindo a ser substituído pelo BPS e BPF, cujos efeitos na saúde e na reprodução ainda não são conhecidos [152].

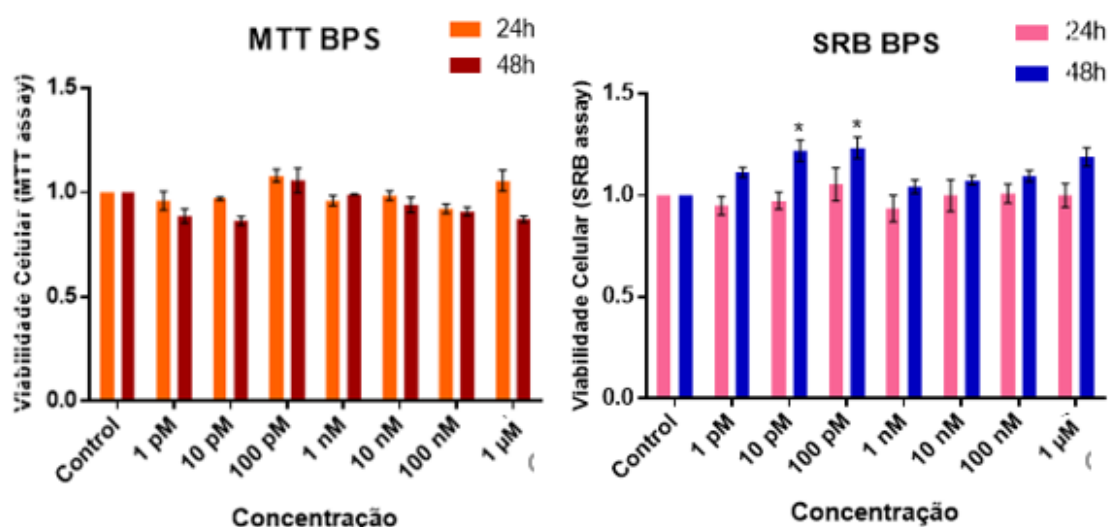
Foi com o propósito de adquirir mais conhecimento acerca destes bisfenóis, presentes e quantificados nas amostras alimentares estudadas, que se foi desenvolver o estudo dos efeitos destes compostos numa linha do estroma uterino [152].

As concentrações utilizadas para os ensaios realizados variaram de 1 pM até 1 μ M, correspondentes aos níveis das concentrações fisiológicas encontradas no sangue em adultos [153].

A viabilidade celular pode ser avaliada por diferentes métodos, passando por integridade da membrana plasmática, síntese de DNA, conteúdo de DNA, atividade enzimática, presença de ATP e condições de redução celular. Os métodos utilizados para a avaliação dos efeitos dos bisfenóis na viabilidade celular foram a SRB e o MTT, já descritos anteriormente.

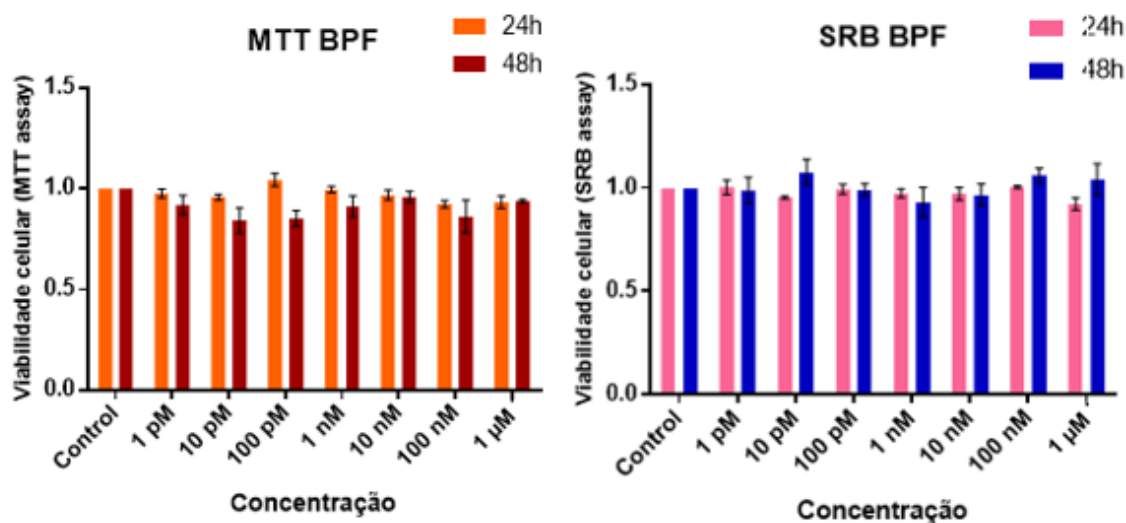


O Bisfenol A, como se pode observar, não alterou a viabilidade celular, para nenhuma das concentrações durante as 24h e 48h de tratamento (Figura 27 e 28). Estes resultados estão em concordância com outros estudos [153]. No entanto, após as 48h de tratamento com a concentração de 1µM, um estudo reporta um aumento da proliferação celular pelo BPA, o que no presente estudo não se verificou. Isto pode dever-se ao facto da linha celular (células decíduais do estroma humano) utilizada pelos investigadores ter sido diferente da linha que se utilizou na realização desta dissertação St-T1b [153].



FIGURAS 29 E 30: EFEITOS DO COMPOSTO BPS NA VIABILIDADE CELULAR ANALISADOS POR ENSAIOS DE MTT E SRB

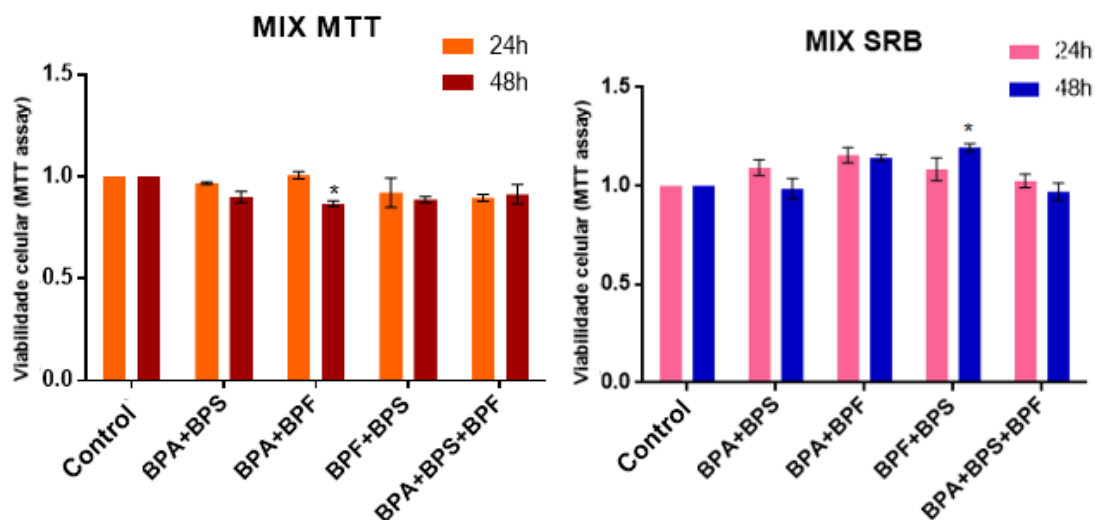
Até a data, não existem dados de comparação como no caso do BPA, uma vez que ainda não existem ensaios de viabilidade celular com tratamento de BPS em células do endométrio. Relativamente ao BPS sabe-se que tem uma atividade estrogénica média, em comparação com o BPA, de $0,32 \pm 0,28$ (média \pm DP), estando assim na mesma ordem de grandeza do BPA [37]. Em termos de resultados obtidos, com este composto, contrariamente ao BPA, obteve-se um aumento da proliferação celular nas 48h para as concentrações de 10 pM e 100 pM no ensaio de SRB (Figura 29 e 30).



FIGURAS 31 E 32: EFEITOS DO COMPOSTO BPF NA VIABILIDADE CELULAR ANALISADOS POR ENSAIOS DE MTT E SRB

Para as concentrações utilizadas não se verificaram alterações na viabilidade celular, (Figura 31 e 32). Futuramente deverão ser realizados estudos com ranges de concentrações mais alargadas, uma vez que este composto está presente em concentrações muito superiores às do BPA, que serviram inicialmente como parâmetros para os estudos realizados para este composto.

Comparativamente com a literatura, ainda não existem dados, para o efeito do BPF na viabilidade celular em células do estroma uterino. Porém está descrito na literatura que a potência estrogénica média (média \pm DP) para BPF em comparação com BPA foi de $1,07 \pm 1,20$, o que indica que o BPF poderá ser mais potente (a nível da atividade estrogénica) que o BPA [37].



FIGURAS 33 E 34: TESTE DE VIABILIDADE CELULAR PARA MISTURAS DE BISFENÓIS A 1 μ M EM ST-T1B DE MTT E SRB RESPECTIVAMENTE

Em termos do consumidor, como se pode verificar pelos resultados das amostras de carne, a comida embalada não está contaminada apenas por um bisfenol, mas sim por vários, sendo estes os resultados mais assertivos em termos da realidade dos alimentos consumidos.

É de notar que relativamente aos ensaios realizados com recurso à mistura de bisfenóis, nesta dissertação, não foi possível encontrar resultados para ensaios semelhantes na literatura. Com isto, procedeu-se à averiguação dos efeitos destes compostos na linha celular acima indicada, com a concentração de 1 μ M.

Como se pode verificar, a mistura de o BPA com o BPF após 48h do tratamento houve uma diminuição da proliferação celular no ensaio de MTT, contrariamente ao caso da mistura de BPF com o BPS em que houve um aumento da proliferação celular com o mesmo tempo de incubação, 48h no ensaio de SRB (Figura 33 e 34).



3: Conclusões

Neste trabalho desenvolveu-se um método eficaz para a determinação simultânea do BPA, BPB, BPAF, BPF, BPE, BPS, BPZ em amostras de carne embaladas e enlatadas.

O método desenvolvido baseou-se na técnica de extração de QuEChERS combinada com a técnica de concentração DLLME e derivatização *in situ* prévia à análise por GC-MS. A junção das duas técnicas diferentes (QuEChERS e DLLME) foi baseada no uso do extrato de MeCN obtidos pelo QuEChERS como solvente dispersivo no processo do DLLME, enquanto o T4CE foi usado como solvente extrativo no DLLME e a adição de anidrido acético permitiu a derivatização (acetilação) dos analitos *in situ*.

Foram também realizados processos de otimização das condições de extração, tendo-se concluído que o melhor procedimento consistia na utilização de 10g de amostra inicial com 5 mL de n-heptano e que os sorbentes eleitos, para a fase do *clean up* do QuEChERS, seriam o C18 e o Z-sept (50 mg de cada).

O método desenvolvido e otimizado foi aplicado 30 amostras, de carne enlatada e embalada (patés, salsichas e refeições pré-feitas) recolhidas aleatoriamente em supermercados da zona Norte. As amostras apresentavam teores de gordura substancialmente diferentes o que levou à realização de duas curvas de calibração para os dois tipos de matrizes mais diferentes, uma em matriz de salsicha, para amostras de salsicha e para amostras de refeições pré-feitas (menor teor de gordura) e uma em matriz de paté (maior teor de gordura).

De um modo geral conseguiu-se para cada um dos bisfenóis analisados elevada linearidade (≥ 0.9186), uma alta % de recuperação, variando entre 57% e 100%, elevada precisão medida por um baixo coeficiente de variação ($\leq 19\%$), um LOD variando entre 0,015 e 0,030 $\mu\text{g/kg}$ e um LOQ variando entre 0,05 e 0,1 $\mu\text{g/kg}$.

As amostras analisadas apresentaram todas BPA, com uma média de 1,475 $\mu\text{g/kg}$ e níveis compreendidos entre 0,382 $\mu\text{g/kg}$ e 3,040 $\mu\text{g/kg}$. O BPB foi detetado com uma ocorrência de 67% com um teor médio de 0,073 $\mu\text{g/kg}$ e concentrações compreendidas entre 0,002 $\mu\text{g/kg}$ e 0,421 $\mu\text{g/kg}$. O BPAF teve uma prevalência de 63% com uma média de 0,125 $\mu\text{g/kg}$ e concentrações compreendidas entre 0,082 $\mu\text{g/kg}$ e 0,191 $\mu\text{g/kg}$. No caso do BPF detetou-se em 70% das amostras com uma concentração média de 6,532 e concentrações compreendidas entre 0,017 $\mu\text{g/kg}$ e 117,421 $\mu\text{g/kg}$. Para o BPS e BPZ, obteve-se para ambos 7% de ocorrência com uma concentração média de 1,323 e 1,191, respetivamente. Com concentrações máximas e mínimas de 0,569 $\mu\text{g/kg}$ e 2,077 $\mu\text{g/kg}$, e de 0,850 $\mu\text{g/kg}$ e 1,533 $\mu\text{g/kg}$, respetivamente. O BPE foi apenas detetado numa das amostras com a concentração de 0,084 $\mu\text{g/kg}$.

Uma vez que os bisfenóis (BPA, BPS, BPF) foram identificados nas amostras alimentares procedeu-se à realização de testes de viabilidade celular, na presença destes compostos. Estes testes foram realizados após tratamento duma linha celular do estroma uterino na presença destes compostos (individualmente e mistura).

Estes estudos celulares foram realizados com intenção de aprofundar a ligação dos bisfenóis à infertilidade feminina. O processo de remodelação do endométrio uterino, envolve, numa primeira fase do ciclo menstrual, uma extensa proliferação destas células do estroma, seguida de uma transformação em células decíduais e por fim regressão destas por apoptose. Estes mecanismos celulares estão altamente controlados por uma panóplia de mediadores lipídicos, proteínas, citocinas, fatores de crescimento, hormonas sexuais, entre outras, sendo que a sua desregulação pode ter um impacto negativo na fertilidade.

Como foi verificado no caso das concentrações utilizadas para o BPA e BPF, estes compostos não afetaram a viabilidade celular. No entanto, o BPS levou a um aumento da proliferação celular nas concentrações de 10 pM e 100 pM após as 48h de tratamento.

A combinação de bisfenóis, para concentrações de 1µM, revelaram resultados inovadores observando-se uma diminuição da taxa metabólica oxidativa mitocondrial após as 48h de tratamento e para o conjunto de BPF com BPS existe um aumento da proliferação celular também após as 48h de tratamento.

Estes estudos acerca dos bisfenóis deverão ser continuados, principalmente nos bisfenóis que vão ser introduzidos maioritariamente no mercado (BPS e o BPF). Deverão ser também realizados estudos acerca de possíveis interferentes no processo de decidualização para todas as condições e concentrações que não mostraram afetar a viabilidade celular.

4: Anexos

TABELA 8: CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS, DE BISFENOL, PARA CADA NÍVEL ANALISADO

		Concentração	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6	Nível 7	Nível 8
BPs	MM	(µg/kg)/L	(µg/kg)/L	(µg/kg)/L	(µg/kg)/L	(µg/kg)/L	(µg/kg)/L	(µg/kg)/L	(µg/kg)/L	(µg/kg)/L
BPA	228,3	10000	0,05	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0	20,0
BPB	242,3	10000	0,05	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0	20,0
BPAF	336,2	10000	0,05	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0	20,0
BPZ	268,4	10000	1,00	2,5	5,0	10,0	50,0	75,0	100,0	200,0
BPE	214,3	10000	0,05	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0	20,0
BPF	200,2	10000	0,05	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0	20,0
BPS	250,3	10000	5,00	10,0	20,0	50,0	75,0	100,0	200,0	400,0

BISFENÓIS REPRESENTADOS DE COR AZUL FORAM PREPARADOS EM METANOL OS RESTANTES FORAM EM MECN

TABELA 9: CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADA (DE ACORDO COM AS INFORMAÇÕES CONTIDAS NO RÓTULO)

Nº	Nome	peso (g)	Prot. 100g/c omida	HC 100 g/co mida	Lip. 100 g/co mida	Sal 100 g/co mida	Composição	Validade	Pais de origem	Marca
1	Chouriço com feijão	420	6.7	8.9	4.0	1.0	Feijão branco, 45.48%, água, chouriço de carne, 5.95% (carne e gordura suínos, couratos, massa de pimentão, sal, especiarias, E451, E331, EE316, E250 E252), chouriço (5.95%, E451, E331, E316, E520, E525), cenoura 2.38%, concentrado de tomate, sal, amido de milho, especiarias e cebola	04-08- 2021	PT	Comercial
2	Salsichas Frankfurt	200	2.3	1.0	2.9	0.3	Carne aves, carne porco, gordura de porco, proteína de soja, especiarias, antioxidantes, emulsionantes, açúcar, conservantes, sal e proteína de leite	25-05- 2020	PT	Comercial

3	Feijoadada Transmontana	420	6.8	6.6	3.8	1.2	Água, feijão encarnado (34.22%), carne suína (18.19%), chouriço de carne (2.38%), carne, gordura e couratos de suína, massa pimentão, sal, especiarias E451, E331, E316 E250, E252, cenoura (2.38%), proteína de soja, concentrado de tomate, banha de suína, puré de batata, cebola, alho e couve	20-06-2021	PT	Comercial
4	Chispalhada	420	8.1	6.4	5.1	1.0	Água, feijão branco (34.29%), chispe de suína (9.64%), cabeça de suína (9.64%), chouriço de carne (2.38%), carne, gordura e couratos de suína, massa pimentão, sal, especiarias E451, E331, E316 E250, E252, cenoura (2.38%), proteína de soja, amido de milho, concentrado de tomate, banha de suína, puré de batata, cebola, alho e couve	19-07-2021	PT	Comercial
5	Paté de fígado de porco	78 (*3	10.7	6.4	8.4	1.3 5	Toucinho de porco, água, fígado de porco (23%), farinha de trigo, cebola, sal, proteína animal, açúcar, E160, E306 e E250	16-11-2019	ESP	Comercial
6	Jardineira	420	6.3	4.1	3.5	0.5 7	Carne de bovino, batata, água, ervilha, cenoura, amido, azeite, sal, alho, açúcares, molho inglês, sulfatos, especiarias e antioxidantes (ascorbato de sódio)	10-11-2018	PT	Comercial
7	Pasta de fígado de porco	125	13.0	1.5	22.0	2.0	Fígado de porco (46%), gordura de porco, água, sal, cebola em pó, extrato de levedura, xarope de glicose, amido milho, açúcar, especiarias, conservantes (citrato de sódio e ascorbato	07-04-2024	ESP	Comercial

							de sódio) e extrato de especiarias			
8	Merenda de carne	175	sem inf.	sem inf.	sem inf.	sem inf.	Carne de suíno, água, gordura de suíno, amido, sal, E450, E621, E316 e E250	19-04-2019	PT	Comercial
9	Mão de vaca com grão	420	11.5	7.7	3.5	0.9 1	Água, mão de bovino, grão, cenoura, chouriço de carne (carne de suíno, gordura de suíno, massa de pimentão, sal proteínas de leite, especiarias, emulsionantes (difosfatos, trifosfatos polifosfatos) gelificantes(carragenina, goma xantanal), antioxidantes(eritorbato de sódio, citrato de sódio), aroma, aroma de fumo)sal, especiarias, nanha de suíno, massa pimentão, dextrose, amido, proteína de soja, alho, açúcar, antioxidantes (ascorbato de sódio e nitrato de sódio)	10-11-2018	PT	Comercial
10	Almôndegas	420	8.6	2.1	8.8	1.5	Carne de suíno, carne de bovino, proteína de soja, água, cebola tostada (cebola, óleo de colza e palma, farinha de trigo, sal), fibra vegetal, sal, alho, coentros, pimenta branca antioxidantes (citrato de sódio) Molho de tomate (tomate, água, cebola, amido, sal, alho, azeite, açúcar e especiarias)	29-06-2019	PT	Comercial
11	Peito de Frango ao natural	80 (*2)	30	0	1.5	0.5	Frango, água e sal	31-03-2020	PT	Branca
12	Patê de fígado de carne de porco	130	16.5	3	9.4	2.3	Carne de suíno, gordura de suíno, fígado de suíno (26%), água, proteína de	22-06-2019	PT	Comercial

							soja, sal, aromas, especiarias, aipo, dextrose, reguladores de acidez, E325, E621, E627, E631 e E250			
13	Tapa negra picante	73	11	1.4	24	2.1	Toucinho, fígado e carne de porco, água, farinha de trigo, fibra vegetal, sal, estabilizadores (tripolifosfato de sódio e carragenina) açúcar, aromas, pimenta de caiena, conservantes (nitrito de sódio) e especiarias	03-02-2022	ESP	Comercial
14	Paté de frango	75	11	5.6	13	1.5	Peito de frango, creme de batata, tapioca com leite, óleo de girassol, água, fibra vegetal e aromatizante natural	02-04-2022	ESP	Comercial
15	Salsichas frankfurt	200	11	3.8	7.7	2.3	carne de aves, carne e gordura de porco, água, amido, proteína de soja, mostarda, difosfatos e trifosfato de sódio, antioxidante, eritorbato de sódio, lactose, monoglutamato de sódio e nitrito de sódio e sal	18-05-2019	PT	Comercial
16	Salsichas tipo frankfurt		11	2.8	12	1.6	Proteína de leite, carne de aves, carne e gordura de porco, água, sal amido, proteína de soja, conservantes, especiarias, antioxidante e açúcar	24-03-2019	PT	Branca
17	Paté com pimenta verde	125	13	6	23	1.9	Fígado de porco, gordura de frango, carne de frango, água, gordura de palma, óleo de coco, pimenta verde, sal, farinha de arroz, E301, E326, E330, E472c, cebola, proteína láctea, especiarias, aromas, E407, E410, extrato de levedura, E250 e E261	12-11-2017	PT	Branca

18	Pate de pato com ervas finas	100	7.6	4	43.3	1.3	Gordura de fígado de porco, leite, fígado de frango, farinha de arroz, sal, especiarias, proteína do leite, ervas finas, dextrina, cultivo ácido láctico, E262, E250, E301, E331, E451 e E452	30-11-2017	ESP	Comercial
19	Pate de pato com cogumelos	65	16.6	1.79	16.5	1.06	Carne de pato, peito de porco, fígado de porco, gordura de porco, cogumelos, pectina, ácido cítrico, gelificante de groselha, sumo de groselha, sal, ovo, natas, chalotas, pimenta e E250	16-11-2019	FR	Comercial
20	Cocktail mini-salsichas	120	10.4	4	15.5	0.12	Carne de suíno, água, frango, peru, couratos, gordura de suíno, proteína de soja, sal, amido, dextrose, especiarias, proteínas do leite, emulsionantes, açúcar, glutamato de monossódico, antioxidantes e conservantes	31-05-2019	PT	Comercial
21	Paté suave	80(*3)	sem inf.	sem inf.	sem inf.	sem inf.	Toucinho, fígado de porco, água, farinha de trigo, sal, especiarias, estabilizador E451 e E4528s, açúcar, potenciador de sabor E621, antioxidantes EE330 e conservante E250	06-05-2020	ESP	Comercial
22	Almôndegas com molho de tomate	300	9.5	11.1	7.8	1.5	Óleo de girassol, farinha de trigo, estabilizadores, leveduras, aromas, proteína de soja, molho de tomate, regulador de acidez, sal, água, fécula de batata, conservantes e antioxidantes	17-07-2018	ESP	Comercial
23	Almôndegas	420	8.3	6.9	11.1	1.25	Carne de porco e peru, toucinho de porco, farinha de trigo, E451, E452, alho, E250, água, cebola, óleo de girassol, tomate, cenoura,	15-06-2021	ESP	Comercial

							fécula de batata, pimento e sal			
24	Pate de fígado de pato	100	10.7	0.54	288	2.29	Fígado e gordura de pato, toucinho de porco, água, fígado de frango, brandy, especiarias, sal, proteína de porco, dextrose, açúcar, E451, E301, E621 e E250	09-01-2018	ESP	Comercial
25	Pate de fígado de porco	78(*3)	9.5	6.8	25.3	1.13	Toucinho de porco, água, fígado de porco, carne de porco, farinha de trigo, cebola, sal, proteína animal, açúcar, dextrose, aroma E160, antioxidante E306, especiarias e conservante E250	23-03-2022	PT	Branca
26	Paté de ave com cogumelos	60	9.2	2.0	37.6	1.5	Carne e gordura de pato, leite, fígado de frango, cogumelos, água, cebola, E250, E301, E330, E331, E451, E452, farinha de arroz, dextrina e dextrose.	18-01-2018	ESP	Comercial
27	Feijoadada asturiana	435	8.4	7.9	8.3	0.87	Feijão, água, bacon, toucinho, cebola, sangue de porco, pimentão doce, sal, óleo de girassol e amido de batata	31-01-2021	ESP	Comercial
28	Salsichas tipo frankfurt	120	10	3.1	12.2	1.7	Carne de aves, carne couratos e gordura de porco, proteína de soja, amido, sal, especiarias, açúcar, aromas, dextrose, proteína de leite, E450, E451, E310, E301, E250 e E621	21-07-2019	PT	Branca
29	Almôndegas		7.9	6.4	12.0	0.95	Água, farinha de trigo, cebola, vinho, concentrado de tomate, banha, cenoura, óleo girassol, fécula de batata, pimento, sal, ervilhas, carnes de porco e peru, alho, E451, E452 e E250	04-09-2021	PT	Branca

30	Feijoadas Asturiana	425	6.4	7.9	8.3	0.8 7	Feijão, água, chouriço, bacon, sal, pimenta, alho, morcela, toucinho, sangue de porco, cebola, pimentão e orégãos	31-12- 2021	ESP	Comercial
----	------------------------	-----	-----	-----	-----	----------	---	----------------	-----	-----------

CONTEÚDO DE PROTEÍNA (PROT.), HIDRATOS DE CARBONO (HC), LÍPIDOS (LIP.) E SAL EM 100G DE COMIDA; COMPOSIÇÃO DE FORMA DESCRITIVA COMO APRESENTAVA A RESPECTIVA EMBALAGEM; A VALIDADE DE CADA UMA DAS AMOSTRAS; O PAÍS DE ORIGEM (PORTUGAL-PT; ESPANHA- ESP; FRANÇA- FR) E A MARCA (COMERCIAL OU BRANCA)



5: Referências

1. Dianin, A., *Condensation products of ketones and phenols*. Journal of the Russian Physical Chemistry Society, 1891, **4**(6): p. 488–517, 523–546, 601–611.
2. Wolstenholme, J.T., Rissman E.F., and Connelly J.J., *The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior*. Horm Behav, 2011, **59**(3): p. 296-305.
3. Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., et al., *A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound*. Fertility and Sterility, 2015, **103**(1): p. 11-21.
4. Bohnet, M., *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, Weinheim: Wiley-VCH , 2003, **125** (35): p 108–204
5. Caballero-Casero, Lunar N. L., Rubio S., *Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review*. Anal Chim Acta, 2016, **908**: p. 22-53.
6. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=66166, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/66166> (accessed January 29, 2018).
7. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=6626, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6626> (accessed January 29, 2018).
8. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=608116, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/608116> (accessed January 29, 2018).
9. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=75575, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/75575> (accessed January 29, 2018).
10. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=232446, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/232446> (accessed January 29, 2018).
11. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=73864, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73864> (accessed January 29, 2018).
12. Cruz, R., Cunha, S.C., Marques, A., et al., *Polybrominated diphenyl ethers and metabolites – An analytical review on seafood occurrence*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2017, **87**: p. 129-144.
13. Kwak, E.S., Just, A, Whyatt, R., et al., *Phthalates, Pesticides, and Bisphenol-A Exposure and the Development of Nonoccupational Asthma and Allergies: How Valid Are the Links?* Open Allergy J, 2009, **2**: p. 45-50.
14. *Polycarbonate Resins*. Chemical Economics Handbook, IHS Markit, 2016. <https://ihsmarkit.com/products/nylon-resins-chemical-economics-handbook.html> (accessed May 29, 2018).
15. Wittcoff, H., Reuben, B.G., *Industrial organic chemicals*, Wiley, 1996, **3**: p.243-542 .
16. Cooper, J.E., Kendig, E.L., Belcher, S.M., *Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles*. Chemosphere, 2011, **85**(6): p. 943-7.
17. Hanberg, A.B., *Low-dose effects of Bisphenol A– identification of points of departure for the derivation of an alternative reference dose* KEMI, 2012, **1**: p.21-30.
18. Boyle, M.A., Martin, J.C., Neuner J.D., *Epoxy Resins*. ASM Handbook, Hexcel Corporation, 2001, **21**: p.523-856.
19. May, C., *Epoxy Resins: Chemistry and Technology, Second Edition*, 1987, **888** (209) : p 25-109.

20. FDA, *Preparation of Food Contact Notifications and Food Additive Petitions for Food Contact Substances: Chemistry Recommendations*. Office of Food Additive Safety, Washington, D.C., 2002, <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/IngredientsAdditivesGRASPackaging/ucm081818.htm> (accessed in 5 May 2018)
21. Ellis, B., *Epoxy Resins*. Chemistry and Technology of Epoxy Resins, 1993, **1**: p.72-116.
22. Björnsdotter, M.K., Boer, J., Ballesteros-Gómez, A., *Bisphenol A and replacements in thermal paper: A review*. Chemosphere, 2017, **182**: p. 691-706.
23. Viñas, R., Watson C.S., *Bisphenol S Disrupts Estradiol-Induced Nongenomic Signaling in a Rat Pituitary Cell Line: Effects on Cell Functions*. Environ Health Persp, 2013, **121**(3): p. 352-358.
24. Biedermann, S., Tschudin, P., Grob, K., *Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, **398**(1): p. 571-576.
25. Lee, T., Nilawat C.R., *Chemical Mixtures in the Environment: Endocrine Disruption Properties of Phthalates and BPA*. Dept. of Environmental and Occupational Health, California State University, Northridge, 2016, **144** (1553-9) : p.5-15.
26. Kang, J.H., Katayama, Y., Kondo F., *Biodegradation or metabolism of bisphenol A: from microorganisms to mammals*. Toxicol, 2006, **217**(2-3): p. 81-90.
27. Sazan, P., Karin, A., Sharon, M., et al., *4,4'-isopropylidenediphenol (Bisphenol-A)*. European Union Risk Assessment Report, 2008, **37**: p. 5-77.
28. Völkel, W., Colnot, T., Csanády, et al., *Metabolism and Kinetics of Bisphenol A in Humans at Low Doses Following Oral Administration*. Chem. Res. Toxicol, 2002, **15**(10): p. 1281-1287.
29. Hanioka, N., Takeda, Y., Tanaka-Kagawa, T., et al., *Interaction of bisphenol A with human UDP-glucuronosyltransferase 1A6 enzyme*. Environ Toxicol, 2008, **23**(3): p. 407-12.
30. Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., et al., *In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies*. Reprod Toxicol (Elmsford, N.Y.), 2007, **24**(2): p. 199-224.
31. Yalcin, E.B., Kulkarni, S.R., Slitt, A.L., et al., *Bisphenol A sulfonation is impaired in metabolic and liver disease*. Toxicol Appl Pharmacology, 2016, **292**: p. 75-84.
32. Cunha, S.C., Fernandes, J.O., *Quantification of free and total bisphenol A and bisphenol B in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry (MD-GC/MS)*. Talanta, 2010, **83**(1): p. 117-125.
33. Calafat, A.M., Kuklenyik, Z., Reidy, J.A., et al., *Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population*. Environ Health Perspect, 2005, **113**(4): p. 391-5.
34. Itoh, H., Iwasaki, M., Hanaoka, T., et al., *Urinary Bisphenol-A Concentration in Infertile Japanese Women and Its Association with Endometriosis: A Cross-Sectional Study*, 2007, **12**: p. 64-258.
35. Michałowicz, J., *Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation*. Environ Toxicol and Pharmacology, 2014, **37**(2): p. 738-758.
36. *Material safety data sheet*. Sigma-aldrich, 2004, <http://terpconnect.umd.edu/~choi/MSDS/Sigma-Aldrich/BISPHENOL%20A.pdf> (accessed in 24 May, 2018).

37. Rochester, J.R., Bolden, A.L., *Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes*. Environ Health Perspect, 2015, **123**(7): p. 643-50.
38. Durham, N.C., *Endocrine Disruptors*. National Institute of Environmental Health Sciences, 2017.
<https://www.niehs.nih.gov/research/supported/exposure/endocrine/index.cfm> (accessed May 2, 2018).
39. Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., et al., *Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations*, 2013, **8**(1): p. e55387.
40. Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Soriano, S., et al., *Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways*. Mol Cell Endocrinol, 2012, **355**(2): p. 201-7.
41. Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., et al., *Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus*. Environ Health Perspect, 2010, **118**(9): p. 1196-203.
42. Rochester, J.R., *Bisphenol A and human health: a review of the literature*. Reprod Toxicol, 2013, **42**: p. 132-55.
43. Richter, C.A., Taylor, J.A., Ruhlen, R.L., et al., *Estradiol and Bisphenol A Stimulate Androgen Receptor and Estrogen Receptor Gene Expression in Fetal Mouse Prostate Mesenchyme Cells*. Environ Health Perspect, 2007, **115**(6): p. 902-908.
44. Ziv-Gal, A., Flaws J.A., *Evidence for bisphenol A-induced female infertility: a review (2007-2016)*. Fertil Steril, 2016, **106**(4): p. 827-56.
45. Midoro-Horiuti, T., Tiwari, R., Watson, C.S., et al., *Maternal bisphenol a exposure promotes the development of experimental asthma in mouse pups*. Environ Health Perspect, 2010, **118**(2): p. 273-7.
46. Xie, M.Y., Ni, H., Zhao, D.S., et al. Exposure to bisphenol A and the development of asthma: A systematic review of cohort studies. Reprod Toxicol (Elmsford, NY), 2016, **65** (224-229).
47. Fan, R., *Neurotoxicity of low bisphenol A (BPA) exposure for young male mice: Implications for children exposed to environmental levels of BPA*, 2017, **229**(1).
48. Wolstenholme, J.T., Rissman E.F., and Connelly J.J., *The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior*. Horm Behav, 2011, **59**(3): p. 296-305.
49. Ejaredar, M., Lee, Y., Roberts, D.J., et al., *Bisphenol A exposure and children's behavior: A systematic review*. J Expos Sci Environ Epidemiol, 2017, **27**(2): p. 175-183.
50. Lee, Y.M., Seong, M.J., Lee, Y.K., et al., *Estrogen receptor independent neurotoxic mechanism of bisphenol A, an environmental estrogen*. J Vet Sci, 2007, **8**(1): p. 27-38.
51. Panzica, G.C., Viglietti-Panzica, C., Mura, E., Quinn, M.J., et al., *Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally-relevant neural circuits*. Frontiers in neuroendocrinology, 2007, **28**(4): p. 179-200.
52. Seachrist, D.D., Bonk, K.W., Ho, S.M., et al., *A Review of the Carcinogenic Potential of Bisphenol A*. Reprod Toxicol (Elmsford, N.Y.), 2016, **59**: p. 167-182.
53. Coster, S., Larebeke N., *Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action*. J Environ Public Health, 2012 **4**(4): p.25-46.
54. Vandenberg, L.N., Ehrlich, S., Belcher, M.S., et al., *Low dose effects of bisphenol A*. Endocr Disruptors, 2013, **4**(1): p. 23-78.
55. *Tolerable Daily Intake (TDI) level for BPA*. EFSA Journal, 2009, **7**:p.28-59.

56. *Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs*. EFSA Journal, 2015, **13**(1): p. 39-78.
57. *Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A*. EFSA Journal, 2010, **8**(9):p.18-29.
58. News, B., *EU bans bisphenol A chemical from babies' bottles*. 25 November 2010. <https://www.bbc.co.uk/news/world-europe-11843820> (acessed in 6 May 2018)
59. Hengstler, J.G., Foth, H., Gebel, T., et al., *Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A*. Crit Rev Toxicol, 2011, **41**(4): p. 263-291.
60. *Loi visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A*, Loi n° 2012-1442 du 24 décembre 2012, 2012.
61. EFSA, *"Controversial chemical: EU authority lowers limit for bisphenol A"* EFSA Journal, January 21, 2015.
62. Birnbaum, L.S., Aungst, J., Schug, T.T., et al., *Working Together: Research- and Science-Based Regulation of BPA*. Environ Health Perspect, 2013, **121**(7): p. a206-a207.
63. *Bisphenol A (BPA): Use in Food Contact Application*. U.S. Food and Drug Administration, 2014, <https://www.fda.gov/newsevents/publichealthfocus/ucm064437.htm> (acessed in 20 May)
64. Network, I.F.S.A., *BISPHENOL A (BPA) - Current state of knowledge and future actions by WHO and FAO* 27 November 2009, http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov09_en.pdf (acessed in May 5)
65. Donohue, M., *Order Adding a Toxic Substance to Schedule 1 to the Canadian Environmental Protection Act*, 1999. Canada Gazette, 2012, **151**(45): p.5-32.
66. Fernandes, J.O., *Desenvolvimento de metodologias de cromatografia gasosa - espectrometria de massa para a determinação de aminas biogénicas em vinhos do porto e em mostos*. Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2001.
67. Kole, P.L., Venkatesh, G., Kotecha, J., Sheshala, R., *Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods*. Biomed Chromatogr, 2011, **25**(1-2): p. 199-217.
68. Ballesteros-Gómez, A., Pérez-Bendito D., *Analytical methods for the determination of bisphenol A in food*. Journal of Chromatography A, 2009, **1216**(3): p:449-469.
69. Thomson, B.M., Grounds, P.R., *Bisphenol A in canned foods in New Zealand: an exposure assessment*. Food Addit Contam, 2005, **22**(1): p. 65-72.
70. Alberti, G., Amendola, V., Pesavento, M., et al., *Beyond the synthesis of novel solid phases: Review on modelling of sorption phenomena*, Coordin Chem Rev, 2012, **256**(1): p. 28-45.
71. Nollet, L., *Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food*, Wiley, 2011, **12**(1): p.367-376.
72. Regueiro, J., Wenzl T., *Determination of bisphenols in beverages by mixed-mode solid-phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2015, **1422**: p. 230-238.
73. Buscher, B., van de Lagemaat, D., Gries, W., et al., *Quantitative analysis of unconjugated and total bisphenol A in human urine using solid-phase extraction*

- and UPLC–MS/MS: Method implementation, method qualification and troubleshooting. *J Chromatogr B*, 2015, **1005**: p. 30-38.
74. Zhang, J.H., Jiang, M., Zou, L., Shi, D., et al., *Selective solid-phase extraction of bisphenol A using molecularly imprinted polymers and its application to biological and environmental samples*. *Anal Bioanal Chem*, 2006, **385**(4): p. 780-6.
 75. Alexiadou, D.K., Maragou, N.C., Thomaidis, N.S., et al., *Molecularly imprinted polymers for bisphenol A for HPLC and SPE from water and milk*. *J Sep Sci*, 2008, **31**(12): p. 2272-82.
 76. Jiang, X., Tian, W., Zhao, C., et al., *A novel sol-gel-material prepared by a surface imprinting technique for the selective solid-phase extraction of bisphenol A*. *Talanta*, 2007, **72**(1): p. 119-25.
 77. Jin, Y., Jiang, M., Shi, Y., et al., *Narrowly dispersed molecularly imprinted microspheres prepared by a modified precipitation polymerization method*. *Anal Chim Acta*, 2008, **612**(1): p. 105-13.
 78. Pichon, V., *Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers*. *J Chromatogr A*, 2007, **1152**(1-2): p. 41-53.
 79. Kubo, T., Hosoya, K., Watabe, Y., et al., *Polymer-based adsorption medium prepared using a fragment imprinting technique for homologues of chlorinated bisphenol A produced in the environment*. *J Chromatogr A*, 2004, **1029**(1-2): p. 37-41.
 80. Shiomi, T., Matsui, M., Mizukami, F., et al., *A method for the molecular imprinting of hemoglobin on silica surfaces using silanes*. *Biomaterials*, 2005, **26**(27): p. 5564-71.
 81. San Vicente, B., Navarro, F., Moreno-Bondi, M.C., *Continuous solid-phase extraction and preconcentration of bisphenol A in aqueous samples using molecularly imprinted columns*. *Anal Bioanal Chem*, 2004, **380**(1): p. 115-22.
 82. Luo, W., Zhu, L., Yu, C., et al., *Synthesis of surface molecularly imprinted silica micro-particles in aqueous solution and the usage for selective off-line solid-phase extraction of 2,4-dinitrophenol from water matrixes*. *Anal Chim Acta*, 2008, **618**(2): p. 147-56.
 83. Zhu, R., Zhao, W., Zhai, M., et al., *Molecularly imprinted layer-coated silica nanoparticles for selective solid-phase extraction of bisphenol A from chemical cleansing and cosmetics samples*. *Analytica Chimica Acta*, 2010, **658**(2): p. 209-216.
 84. Buszewski, B., Szultka M., *Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2012, **42**(3): p. 198-213.
 85. Zheng, X., Wojcik, R., Zhang, X., et al., *Coupling Front-End Separations, Ion Mobility Spectrometry, and Mass Spectrometry For Enhanced Multidimensional Biological and Environmental Analyses*. *Annual review of analytical chemistry* (Palo Alto, Calif.), 2017, **10**(1): p. 71-92.
 86. Dittmar, T., Koch, B., Hertkorn, N., et al., *A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater*. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2008, **6**(6): p. 230-235.
 87. Aguiar, C.A. S., Dayane F. S., Anizio M. F., *Extração em fase sólida de resíduos de agrotóxicos de água superficial, empregando um sorvente de menor retenção*. *Quim.* 2018, **41** (6): p. 641-647.
 88. Cunningham, J., Won-Seok, K., Doet, A., al., *Extraction of bisphenol-A and 17 β -estradiol from water samples via solid-phase extraction (SPE)*, 2014, **33**: p. 59-77.
 89. Covaci, A., Voorspoels S., *Optimization of the determination of polybrominated diphenyl ethers in human serum using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, **827**(2): p. 216-23.

90. Maragou, N.C., Lampi, E.N., Thomaidis, N.S., et al., *Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2006, **1129**(2): p. 165-73.
91. Petrarca, M.H., Godoy H.T., *Gas chromatography-mass spectrometry determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in baby food using QuEChERS combined with low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction*. Food Chem, 2018, **257**: p. 44-52.
92. Gao, M., Zhou, Y., Sheng, Y., et al., *Determination of 12 bisphenol substances in functional foods by QuEChERS and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Se Pu, 2014, **32**(11): p. 1201-8.
93. Cunha, S.C., Cunha, C., Ferreira, A.R., et al., *Determination of bisphenol A and bisphenol B in canned seafood combining QuEChERS extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2012, **404**(8): p. 2453-63.
94. Cunha, S.C., Oliveira C., Fernandes J.O., *Development of QuEChERS-based extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of bisphenol A and tetrabromobisphenol A in seafood: fish, bivalves, and seaweeds*. Anal Bioanal Chem, 2017, **409**(1): p. 151-160.
95. Cunha, S.C., Almeida, C., Mendes, E., et al., *Simultaneous determination of bisphenol A and bisphenol B in beverages and powdered infant formula by dispersive liquid-liquid micro-extraction and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2011, **28**(4): p. 513-26.
96. Pereira, V.L., Fernandes, J.O., Cunha S.C., *Comparative assessment of three cleanup procedures after QuEChERS extraction for determination of trichothecenes (type A and type B) in processed cereal-based baby foods by GC-MS*. Food Chemistry, 2015, **182**: p. 143-149.
97. Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M.R., et al., *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction*. J Chromatogr A, 2006, **1116**(1-2): p. 1-9.
98. Cunha, S.C., Pena, A., Fernandes, J.O., *Dispersive liquid-liquid microextraction followed by microwave-assisted silylation and gas chromatography-mass spectrometry analysis for simultaneous trace quantification of bisphenol A and 13 ultraviolet filters in wastewaters*. J Chromatogr A, 2015, **1414**: p. 10-21.
99. Leong, M.I., Fuh, M.R., et al., *Beyond dispersive liquid-liquid microextraction*. J Chromatogr A, 2014, **1335**: p. 2-14.
100. Cunha, S.C., Fernandes, J.O., *Assessment of bisphenol A and bisphenol B in canned vegetables and fruits by gas chromatography-mass spectrometry after QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction*. Food Control, 2013, **33**(2): p. 549-555.
101. Orata F., *Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis*, 2012. <https://www.intechopen.com/books/advanced-gas-chromatography-progress-in-agricultural-biomedical-and-industrial-applications/derivatization-reactions-and-reagents-for-gas-chromatography-analysis> (accessed May 2, 2018).
102. Feshin, D.B., Fimushkin P.V., Brodskii, E.S., et al., *Determination of bisphenol A in foods as 2,2-bis-(4-(isopropoxycarbonyloxy)phenyl)propane by gas chromatography/mass spectrometry*. Journal of Analytical Chemistry, 2012, **67**(5): p. 460-466.
103. Marcos, J., Pozo O.J., *Derivatization of steroids in biological samples for GC-MS and LC-MS analyses*. Bioanalysis, 2015, **7**(19): p. 2515-36.

104. Kuo, H.W., Ding W.H., *Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2004, **1027**(1-2): p. 67-74.
105. K. Szyrwińska¹, A.K., Rykowska I., Wasiak W., et al., *Derivatization and gas chromatography-low-resolution mass spectrometry of bisphenol a*. Acta chromatographica N18, 2007.
106. Li, X., Lia, L., Shichun, Z., et al., *Determination of Bisphenol A in Landfill Leachate by Solid Phase Microextraction with Headspace Derivatization and Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry*. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, **34**(3): p. 325-328.
107. Taylor, T., *Important Aspects of UV Detection for HPLC*. LCGC North America, 2015, **33**: p. 870.
108. Shao, B., Han, H., Li, D., et al., *Analysis of nonylphenol, octylphenol and bisphenol A in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction*. Se Pu, 2005, **23**(4): p. 362-5.
109. Heidorn, M., *The Role of Temperature and Column Thermostatting in Liquid Chromatography*, Thermo Fisher Scientific, 2016. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/posters/PN-71314-ISC2014-UHPLC-Thermostatting-PN71314-EN.pdf> (accessed in May 7).
110. Barbarin, N., J.D. Henion, Y. Wu, *Comparison between liquid chromatography-UV detection and liquid chromatography-mass spectrometry for the characterization of impurities and/or degradants present in trimethoprim tablets*. J Chromatogr A, 2002, **970**(1-2): p. 141-54.
111. Grumetto, L., Montesano, D., Seccia, S., et al., *Determination of Bisphenol A and Bisphenol B Residues in Canned Peeled Tomatoes by Reversed-Phase Liquid Chromatography*. J Agric Food Chem, 2008, **56**(22): p. 10633-10637.
112. Benecyo, J.E., *Simultaneous Determination of BPA and BPS Using UV/Vis Spectrophotometry and HPLC*. Ouachita Baptist University Scholarly Commons Ouachita, 2016.
113. Li, S., Chen, F., Liu, F., et al., *Rapid Detection of Bisphenol A in Water Samples by High-Performance Liquid Chromatography Based on Syringe Filters with Nylon Membrane Extraction*. J Liq Chromatogr R T, 2015, **38**(15): p. 1474-1478.
114. Ragab, M.A.A., Galal, S.M., Korany, M.A., et al., *High performance thin-layer and high performance liquid chromatography coupled with photodiode array and fluorescence detectors for analysis of valsartan and sacubitril in their supramolecular complex with quantitation of sacubitril-related substance in raw material and tablets*. J Chromatogr Sci, 2018, **56**(6) :p.498-509.
115. Fattore, M., Russo, G., Barbato, F., et al., *Monitoring of bisphenols in canned tuna from Italian markets*. Food Chem Toxicol, 2015, **83**: p. 68-75.
116. Russo, G., Barbato, F., Grumetto, L., et al., *Development and Validation of a LC-FD Method for the Simultaneous Determination of Eight Bisphenols in Soft Drinks*, 2016, **9**: p. 5-33.
117. Pitt, J.J., *Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry*. Clin Biochem Rev, 2009, **30**(1): p. 19-34.
118. Ho, C.S., Lam, C.W., Chan, M.H., et al., *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications*. Clin Biochem Rev, 2003, **24**(1): p. 3-12.
119. Hoffmann, E., V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd Edition, Wiley, 2007, **3**: p. 253-648.
120. Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galceran, M.T., *Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Chim Acta, 2011, **683**(2): p. 227-33.

121. Lee, C., Kim, C.H., Kim, S., et al., *Simultaneous determination of bisphenol A and estrogens in hair samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017, **1058**: p. 8-13.
122. Zuo, H., Yang, F., Huang, W., et al., *Preparative Gas Chromatography and Its Applications*, J Chromatogr Sci, 2013, **51**: p. 704–715.
123. Dekant, W., Volkel, W., *Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures*. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, **228**(1): p. 114-34.
124. Fothergill, W.T., *Gas chromatography. Technique*. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 1968, **61**(5): p. 525-528.
125. Rastkari, N., Ahmadvani, R., Yunesian, M., et al., *Sensitive determination of bisphenol A and bisphenol F in canned food using a solid-phase microextraction fibre coated with single-walled carbon nanotubes before GC/MS*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2010, **27**(10): p. 1460-8.
126. Selvaraj, K.K., Shanmugam, G., Sampath, S., et al., *GC–MS determination of bisphenol A and alkylphenol ethoxylates in river water from India and their ecotoxicological risk assessment*. Ecotoxicol Environ Saf, 2014, **99**: p. 13-20.
127. Lo Turco, V., Di Bella, G., Potorti, A.G., et al., *Determination of plasticisers and BPA in Sicilian and Calabrian nectar honeys by selected ion monitoring GC/MS*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2016, **33**(11): p. 1693-1699.
128. Correia-Sá, L., Norberto, S., Delerue-Matos, C., et al., *Micro-QuEChERS extraction coupled to GC–MS for a fast determination of Bisphenol A in human urine*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018, **1072**: p. 9-16.
129. Cao, X.L., S. Popovic, *Solid phase extraction of large volume of water and beverage samples to improve detection limits for GC-MS analysis of bisphenol A and four other bisphenols*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2018, **35**(1): p. 49-55.
130. Koivunen, M.E., Krogsrud, R.L., *Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories*. Laboratory Medicine, 2006, **37**(8): p. 490-497.
131. Goda, Y., Kobayashi, A., Fukuda, K., et al., *Development of the ELISAs for detection of hormone-disrupting chemicals*. Water Sci Technol, 2000, **42**(7-8): p. 81.
132. Kim, A., Li, C.R., Jin, C.F., et al., *A sensitive and reliable quantification method for Bisphenol A based on modified competitive ELISA method*. Chemosphere, 2007, **68**(7): p. 1204-9.
133. Zhao, M.P., Li, Y.Z., Guo, Z.Q., et al., *A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of estrogenic bisphenols*. Talanta, 2002, **57**(6): p. 1205-10.
134. J Moreno, M., D'Arienzo, P., Manclús, J.J., et al., *Development of monoclonal antibody-based immunoassays for the analysis of bisphenol A in canned vegetables*. J Environ Sci Health B , 2011, **46**: p. 509-17.
135. Kuruto-Niwa, R., Tateoka, Y., Usuki, Y., et al., *Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum*. Chemosphere, 2007, **66**(6): p. 1160-4.
136. Gellersen, B., Brosens J.J., *Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure*. Endocr Rev, 2014, **35**(6): p. 851-905.
137. Su, R.W., A.T. Fazleabas, *Implantation and Establishment of Pregnancy in Human and Nonhuman Primates*. Adv Anat Embryol Cel, 2015, **216**: p. 189-213.
138. Corbacho, A.M., Escalera, G.M., Clapp, C., *Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis*. J Endocrinol, 2002, **173**(2): p. 219-38.

139. Teklenburg, G., Salker, M., Molokhia, M., et al., *Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation*. PLoS One, 2010, **5**(4): p 4-20.
140. Koutsaki, M., Sifakis, S., Zaravinos, A., et al., *Decreased placental expression of hPGH, IGF-I and IGFBP-1 in pregnancies complicated by fetal growth restriction*. Growth Horm IGF Res, 2011, **21**(1): p. 31-6.
141. Kajihara, T., Tanaka, K., Oguro, T., et al., *Androgens modulate the morphological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized in vitro*. Reprod Sci, 2014, **21**(3): p. 372-80.
142. Takeuchi, T., Tsutsumi, O., Ikezuki, Y., et al., *Positive Relationship between Androgen and the Endocrine Disruptor, Bisphenol A, in Normal Women and Women with Ovarian Dysfunction*. Endocr J, 2004, **51**(2): p. 165-169.
143. Cobellis, L., Colacurci, N., Trabucco, E., et al., *Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women*. Biomed Chromatogr, 2009, **23**(11): p. 1186-90.
144. Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Sonta, S., et al., *Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage*. Hum Reprod, 2005, **20**(8): p. 2325-9.
145. Olson, M.R., Su, R., Flaws, J.A., et al., *Bisphenol A impairs decidualization of human uterine stromal fibroblasts*. Reprod Toxicol, 2017, **73**: p. 339-344.
146. Samalecos, A., Reimann, K., Wittmann, S., et al., *Characterization of a novel telomerase-immortalized human endometrial stromal cell line, St-T1b*. Reprod Biol Endocrinol, 2009, **7**: p. 76.
147. Cunha, S.C., *Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas*. FFUP, 2007.
148. Noonan, G.O., Ackerman, L.K., Begley, T.H., *Concentration of Bisphenol A in Highly Consumed Canned Foods on the U.S. Market*. J Agric Food Chem, 2011, **59**(13): p. 7178-7185.
149. Thomson *, B.M., Grounds, P.R., *Bisphenol A in canned foods in New Zealand: An exposure assessment*. Food Addit Contam, 2005, **22**(1): p. 65-72.
150. Wyness, L., O'Connor, E.W., Williams, E. B., et al., *Red meat in the diet: an update*. Nutrition Bulletin, 2011 **36**(1): p.24-77.
151. Liao, C., Kannan, K., *Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure*. J Agric Food Chem, 2013, **61**(19): p. 4655-62.
152. Olson, M.R., Su, R., Flaws, J.A., et al., *Bisphenol A impairs decidualization of human uterine stromal fibroblasts*. Reprod Toxicol, 2017, **73** :p.339-344.
153. Mannelli, C., Szóstek, A.Z., Lukasik, K., et al., *Bisphenol A modulates receptivity and secretory function of human decidual cells: an in vitro study*. Reproduction, 2015, **150**(2): p. 115-25.

